

Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Aktivierung kleiner
Moleküle an Übergangsmetall-Schwefel-Bindungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-
Schiller-Universität Jena

von Dipl. Chem. Claudia Wolf

geboren am 20.03.1977 in Pößneck

Gutachter:

1.

2.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Kreisel für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, bedanken. Danke für das Vertrauen, die oft so aufbauenden Worte und für die Gelegenheiten mich für kurze Zeit in der Lehre auszuprobieren.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Wolfgang Weigand für die immer neuen Ideen und die Hilfestellung am Beginn meiner Qualifikationsphase bedanken.

Ich danke Dr. Johannes Käßbohrer für die Vorarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche im Technikum.

Bei Renate Grunert und Marina Sammler bedanke ich mich ganz herzlich für die oft langwierige Überwachung der Technikumsexperimente und die vielen praktischen Kniffe, die ich durch die Zusammenarbeit lernen durfte.

Für die viele Geduld und stetige, nie müde werdenden Diskussionsbereitschaft, die auch hier und da mal über die wissenschaftlichen Probleme hinausgingen danke ich ganz besonders Dr. Susann Meyer, Roger Gorges, Dana Kralisch und natürlich Dr. Jan Lifka, außerdem auch ganz herzlich der ganzen Arbeitsgruppe für die familiäre Atmosphäre und die oft von mir gesuchten guten Ratschläge und Frau Lienig für die häufigen Chauffeurdienste.

Ich danke Frau Apfel für die analytischen Untersuchungen, die sie wahrscheinlich die eine oder andere Überstunde und vor allem Nerven gekostet haben und Mark Dörr für die Einführung in die Programmierung und seine Unterstützung.

Meiner Familie danke ich ganz besonders für die Geduld und den gelegentlichen Schups in die richtige Richtung.

DANKSAGUNG	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	9
2. HYPOTHESEN ZUR ENTSTEHUNG DES LEBENS	12
2.1 DIE URSUPPE	14
2.2 GRUNDBAUSTEINE DES LEBENS AUS DEM WELTALL?	18
2.3 LEBENSENTSTEHUNG UNTER TIEFSEE-BEDINGUNGEN	19
2.4 CHEMOAUTOTROPHER URSPRUNG DES LEBENS	21
3. AKTIVIERUNG / FIXIERUNG KLEINER MOLEKÜLE	29
3.1 KOHLENSTOFF-FIXIERUNG	29
3.1.1 <i>Natürliche Kohlenstoff-Fixierung (Photosynthese)</i>	29
3.1.2 <i>Anthropogene Kohlenstoff-Fixierung</i>	37
3.2 STICKSTOFF-REDUKTION	38
3.2.1 <i>Natürliche Stickstoff-Reduktion</i>	38
3.2.2 <i>Anthropogene Stickstoff-Reduktion</i>	43
4. STICKSTOFF-REDUKTION AN EINER EISENSULFID-OBERFLÄCHE	48
4.1 EISENSULFIDE	49
4.2 VERSUCHSAPPARATUR	52
4.3 DURCHFÜHRUNG DER STICKSTOFF-FIXIERUNGS-REAKTION	55
4.4 BEI DER REAKTIONSFÜHRUNG AUFGETRETENE PROBLEME UND IHRE LÖSUNGEN	57
4.5 ANALYTIK DES HAUPTVERSUCHES	59
4.5.1 <i>Aquaquant® der Fa. Merck (Berthelot's Reaktion)</i>	59
4.5.2 <i>Ammoniak-Enzymtest der Fa. Boehringer Mannheim</i>	60
5. DIREKTE OPTIMIERUNG DER DISTICKSTOFF-REDUKTIONSREAKTION	62
5.1 AUTOMATISIERUNG DER VERSUCHSAPPARATUR	62
5.2 AKTIVIERUNG DES DISTICKSTOFFS MIT UV-LICHT	65
6. INDIREKTE OPTIMIERUNG MIT HILFE VON MODELLSYSTEMEN	70
6.1 PHENYLPYRUVAT	70
6.2 REDUKTION VON NO _x AN DER EISENSULFID-OBERFLÄCHE	91
6.3 REDUKTION MITTELS „MICELLEN“-EISENSULFID	92

7. ZUSAMMENFASSUNG	95
8. AUSBLICK.....	97
9. EXPERIMENTELLER TEIL.	98
9.1. DARSTELLUNG VON PHENYLALANIN	98
9.2. STANDARDS FÜR DIE KALIBRATION DER GYMKOTHEK-HPLC	99
9.3. REDUKTION VON PHENYLPYRUVAT OHNE NH ₄ CL	99
9.4. REDUKTION VON PHENYLPYRUVAT MITTELS MISCHSULFIDEN	100
9.5. REDUKTION VON PHENYLPYRUVAT UNTER UV-LICHT-BESTRAHLUNG.....	100
9.6. REDUKTION VON STICKSTOFF ZU AMMONIAK.....	101
9.7. REDUKTION VON STICKSTOFF UNTER UV-LICHT-BESTRAHLUNG.....	102
9.8. REDUKTION VON STICKSTOFFMONOXID	102
9.9. REDUKTIVE AMINIERUNG VON PHENYLPYRUVAT MITTELS FeS-MICELLEN	103
10. LITERATURVERZEICHNIS.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

ANHANG A

ANHANG B

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Etappen zur Entstehung des Lebens	13
Abb. 2: Apparatur nach Miller	15
Abb. 3: Hydrothermaler Schlot "black smoker" (nach: Understanding Earth von Frank Press und Raymond Siever © 1994, 1998, W. H. Freeman and Company).....	20
Abb. 4: Aufnahmen von Mikrosphären aus Protenoiden	23
Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine knospende Mikrosphäre	24
Abb. 6: Citronensäurezyklus	26
Abb. 7: Präbiotischer Citronensäurezyklus.....	27
Abb. 8: Absorptionsspektren verschiedener photosynthetischer Pigmente.....	30
Abb. 9: Schematischer Überblick über die cyanobakterielle Photosynthese	32
Abb. 10: Nitrogenaseenzym	40
Abb. 11: Strukturmodell des Eisen-Molybdän-Cofaktors der Eisen-Molybdän- Nitrogenase	41
Abb. 12: Fe-Protein Zyklus der Nitrogenase	42
Abb. 13: Diagramm Temperatur/Ausbeute	44
Abb. 14: Mögliche Zwischenprodukte bei der Reduktion von Distickstoff am [HIPTN ₃ N]Mo-Zentrum.....	47
Abb. 15: Anordnung im Pyritgitter	49
Abb. 16: Aufnahmen von Eisensulfid - (a) 360 Mio. Jahre altes Eisensulfid hydrothermaler Herkunft, (b) und (c) elektronenmikroskopische Aufnahmen von 360 Mio. Jahre altem Eisensulfid aus Irland, (d) elektronenmikroskopische Aufnahme von Eisensulfid, hergestellt aus Na ₂ S und FeCl ₂	50
Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Eisensulfid-Nanopartikeln..	51
Abb. 18: Schema der Pilot-Plant-Anlage	54

Abb. 19: Aufnahme der Pilot-Plant-Anlage zur Stickstoffreduktion ([1] Reaktionsgefäß, [2] Rührer, [3] Kühler, [4] saure Gaswäsche ($n/1000 \text{ H}_2\text{SO}_4$), [5] Temperatursteuerung, [6] Kryostat).....	62
Abb. 20: Hauptsteuerfenster des Programms	63
Abb. 21: Ausschnitt aus dem Programmcode der graphischen Programmiersprache HP-Vee	64
Abb. 22: Dünnschichtapparatur zur UV-Aktivierung von Distickstoff	66
Abb. 23: Aufnahme der UV-Dünnschicht-Apparatur	67
Abb. 24: Röntgenpulverdiffraktogramm einer 30:1-Mischung von Ni/FeS aus NiSO_4 , FeSO_4 und Na_2S (UV-Versuch)	69
Abb. 25: Röntgenpulverdiffraktogramm von frisch gefälltem Eisensulfid mit $\text{FeK}\alpha$ -Strahlung	74
Abb. 26: Reaktionsverlauf über 6 Stunden	76
Abb. 27: Auswertung der Kinetik-Daten nach dem Geschwindigkeits-Gesetz pseudo erster Ordnung	77
Abb. 28: Auswertung der Kinetik-Daten nach dem Geschwindigkeits-Gesetz pseudo zweiter Ordnung	77
Abb. 29: Mögliches Formelschema für eine Reaktion erster Ordnung bezogen auf Phenylpyruvat	78
Abb. 30: HPLC-Chromatogramm - Phenylpropionsäure.....	79
Abb. 31: Übersicht über Mischsulfid-Versuche (5 h Reaktionszeit) $\text{FeS} = 100\%$	83
Abb. 32: Übersicht über Mischsulfid-Versuche (17 h Reaktionszeit) $\text{FeS} = 100\%$	84
Abb. 33 UV-Versuchsaufbau	86
Abb. 34: HPLC-Chromatogramm	89
Abb. 35: UV-Spektrum von Phenylalanin	89
Abb. 36: Röntgenpulverdiffraktogramm einer 1:1-Mischung von Co/FeS aus CoCl_2 , FeSO_4 und Na_2S	90
Abb. 37: Eisensulfid-Nanopartikel.....	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ergebnisse der Miller-Experimente – quantitative Auflistung der Produkte	17
Tab. 2: Mischsulfid-UV-Versuche.....	68
Tab. 3: Einfluss der Reaktionszeit auf die Ausbeute an Phenylalanin	75
Tab. 4: Einfluss der Reaktionstemperatur	75
Tab. 5: Einfluss der Eduktkonzentration.....	75
Tab. 6: Geschwindigkeitsgesetze	76
Tab. 7: Mischsulfid-Versuche (5h, 80°C).....	81
Tab. 8: Mischsulfid-Versuche (17h, 80°C).....	82
Tab. 9: Übersicht Versuche zur reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat mit UV- Licht-Bestrahlung	87
Tab. 10: Eluentenverhältnisse zur HPLC-Analytik.....	88
Tab. 11: Reduktion von Stickstoffmonoxid an der Eisensulfid-Oberfläche.....	92

1. Einleitung

Die Entstehung des Lebens ist wahrscheinlich eines der größten noch ungelöste Rätsel der Erde. Dieses Rätsel zu entschlüsseln erfordert nicht nur großes wissenschaftliches Verständnis, sondern auch ein gewisses Maß an abstrakter Vorstellungskraft und Phantasie. Heute sind wir in der Lage, brauchbare Modelle für die Lösung dieser Fragestellung zu entwickeln und diese experimentell zu überprüfen. Aber darauf werde ich später zu sprechen kommen.

Neben Wasser, ohne das kein uns bekanntes Leben existieren kann, sind Ammoniak, Wasserstoff und Methan weitere grundlegende Bausteine für die Bildung von Biomolekülen.

Ammoniak hat eine nicht zu unterschätzende biochemische Bedeutung als unverzichtbarer Bestandteil für die Entstehung aller Aminosäuren, Proteine und Nucleinsäuren oder auch von Chlorophyll und Hämoglobin. Dabei ist seine präbiotische Herkunft noch unzureichend geklärt. Trotzdem bildete er einen wesentlichen Baustein für eine Vielzahl von Theorien, die seit Beginn des

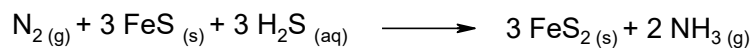
20. Jahrhunderts über die Entstehung des Lebens auf der Erde aufgestellt wurden. Neben Helium und Wasserstoff gilt Ammoniak im interstellaren Raum als ubiquitäres Gas. Der Ammoniakgehalt der ersten Uratmosphäre resultiert vermutlich aus vulkanischen Eruptionen. Aber wäre auch ein anderer Zugang möglich? In welcher Form spielt Ammoniak für die belebte Natur eine wichtige Rolle?

Sowohl leicht lösliche Ammoniumsalze, als auch Nitrate, die Salze der Salpetersäure, dienen den grünen Pflanzen als Stickstoffquelle für den Aufbau neuen organischen Materials, welches als Nahrung für alle nicht zur Photosynthese befähigten Organismen dient.

Aufgabenstellung:

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 436 wurden „Metallvermittelte Reaktionen nach dem Vorbild der Natur“ untersucht. In diesem Kontext entstanden mehrere Arbeiten, welche sich unter dem Titel „Aktivierung kleiner Moleküle an Übergangsmetall-Schwefel-Verbindungen“ in die Forschung eingliedern. In der hier vorliegenden Arbeit soll eine durchaus denkbare Möglichkeit der präbiotischen NH_3 - Bildung durch direkte Reduktion molekularen Stickstoffs näher betrachtet und beschrieben werden.

Es handelt sich hierbei um die Aktivierung von Distickstoff unter Laborbedingungen an einfachen Eisen-Schwefel-Verbindungen in wässrigem Milieu, unter Normaldruck und Temperaturen, die 80°C nicht wesentlich überschreiten, also durchaus Reaktionsbedingungen, die in der präbiotischen Zeit im Urozean gegeben waren.



$$\Delta G^\circ < 0$$

Gl. 1

Diese eigentlich „einfache“ und im ersten Moment offensichtlich „unspektakuläre“ Reaktion erforderte, wie sich im Laufe der Arbeit zeigte, in ihrer Durchführung die Lösung einer Fülle, oft nicht zu trennender, in ihrer Durchführung oft mühsamer Aufgaben, etwa

- Anlageaufbau,
- Analytikentwicklung,
- Durchführung von Modellreaktionen,
- Definierte Fällung von Eisensulfid,
- pH-Wert-Überwachung,
- gesteuerte Versuchführung über längere Zeiträume.

Meine Untersuchungsschwerpunkte lagen vor allem bei der Durchführung von Modellreaktionen, welche zum einen Aufschluss über den Mechanismus der Reaktion geben und zum anderen zur Charakterisierung des Eisensulfids beitragen sollten. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der definierten Fällung von Eisensulfid, welche durch eine Computersteuerung realisiert wurde.

Die Aufgaben lassen sich klar nur in ihrer Gesamtheit darstellen und nicht in jedem Fall eindeutig abgrenzen. Ich möchte deshalb bereits an dieser Stelle den Herren Dr. J. Käßbohrer und Dr. M. Dörr danken, mit denen ich die Gesamtaufgabe Hand in Hand gelöst habe. Gleichzeitig möchte ich um Nachsicht bei beiden bitten, falls es mir nicht klar genug gelungen ist, in jedem Fall meine Ergebnisse und Arbeiten deutlich genug herauszustellen und abzugrenzen.

Um die Bedeutung oben genannter Reaktion zu illustrieren und ihre Einordnung in den Gesamtprozess der Lebensentstehung besser verstehen zu können, wird im folgenden ein kurzer Abriss der bisher bekannten Daten und Fakten gegeben.

2. Hypothesen zur Entstehung des Lebens

Nach zahlreichen Untersuchungen von Meteoriten geben die Wissenschaftler das Alter unseres Sonnensystems, welches aus einer Wolke kosmischen Staubes entstanden ist, mit ca. 4,6 Mrd. Jahren an. Die frei werdende kinetische Energie einer Vielzahl von Meteoriten- und Asteroideneinschlägen auf der noch jungen Erde und der Zerfall radioaktiver Elemente, hielten die Oberflächentemperatur der Erde weit über 1000°C und somit noch für mehrere Mio. Jahre flüssig. Durch diese hohe Temperatur verflüchtigte sich die seit der Erdentstehung vorhandene erste Atmosphäre, die so genannte „Primordialatmosphäre“, welche aus Wasserstoff, Stickstoff, Kohlenoxiden und Edelgasen bestand, wegen deren leichten Flüchtigkeit größtenteils in den Weltraum. Lediglich Methan und Ammoniak dürften in der Primordialatmosphäre verblieben sein. Nach allmählicher Abkühlung der Erdoberfläche fand eine Fragmentierung der Oberfläche statt. Es folgte die Reduktion des Eisen- und Nickeloxids, welche in die Tiefe absanken und den Erdkern ausbildeten [1]. Abb. 1 soll eine kleine Übersicht der Stationen der Entstehung des Lebens auf der Erde geben. Nachdem sich die Erdoberfläche bis unter 100°C abgekühlt hatte, kondensierte der aus dem Erdinneren ausgasende Wasserdampf und bildete in Mulden zunächst Seen und schließlich Ozeane. Entscheidend für die Entstehung von Leben auf der Erde ist neben Wasser die Zusammensetzung der Uratmosphäre, die lange Zeit sehr umstritten war. Man geht davon aus, dass vor der Entstehung der Atmosphäre mit heutiger Zusammensetzung schon ein bzw. zwei unterschiedlich reduzierende „Uratmosphären“ bestanden haben. Beim Prozess der Krustenbildung und den häufigen Vulkanausbrüchen wurden große Mengen an Gasen freigesetzt. Der Hauptbestandteil vulkanischer Gase ist mit 80 % Wasserdampf (H_2O), gefolgt von 10 % Kohlendioxid (CO_2), 7 % Schwefelwasserstoff (H_2S), 0,5 % Wasserstoff (H_2) und 0,5 % Kohlenmonoxid (CO) [2]. Da auf der jungen Erde noch lange Zeit ausgeprägter Vulkanismus herrschte, vermutet man die eben genannten Gase auch in der

Uratmosphäre. Hinzu kamen möglicherweise noch die reduzierten Formen, wie Methan (CH_4) und Ammoniak (NH_3). Durch die Kondensation des Wasserdampfes und den daraus folgenden Regen (Dauer ca. 40.000 Jahre) wurde Kohlendioxid aus der Atmosphäre gewaschen und es kam zur Ausbildung von Carbonatsedimenten im Ozean.

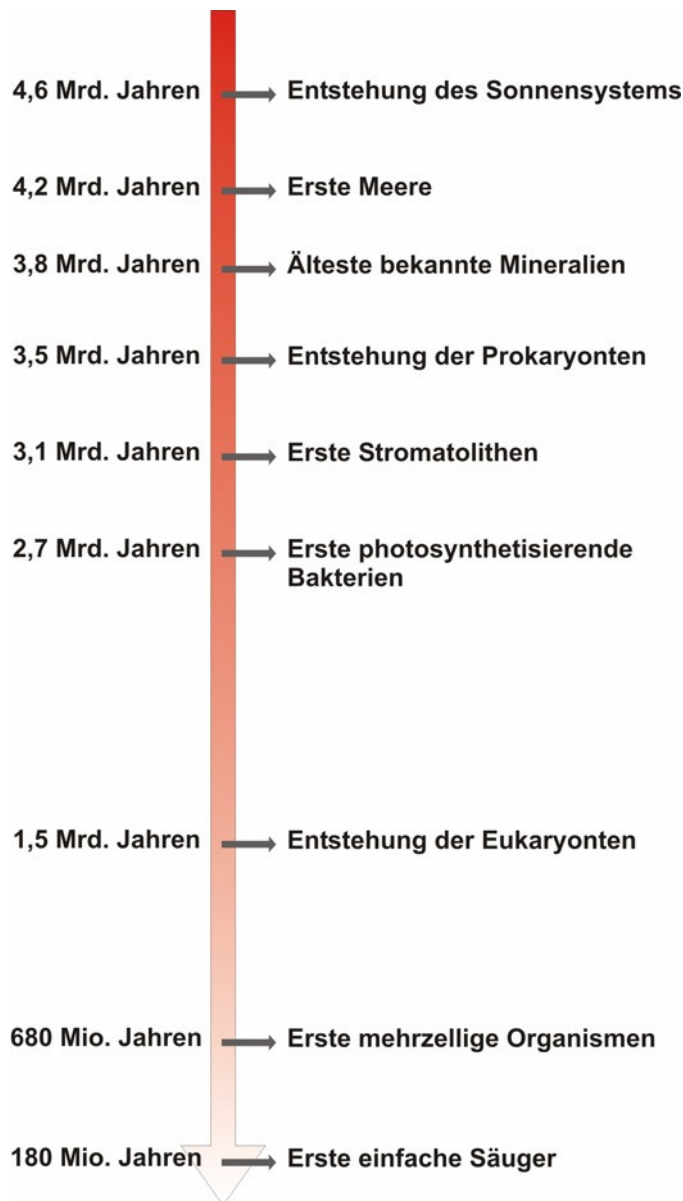


Abb. 1: Etappen zur Entstehung des Lebens

Das bislang älteste gefundene Gestein der Erde entdeckten kanadische Wissenschaftler bei Kartographie-arbeiten im Norden von Quebec [3]. Durch umfangreiche Isotopen-Untersuchungen konnte das Alter des Gesteins zu 3,8 Mrd. Jahre bestimmt werden. Die ältesten gefundenen Fossilien sind 3,5 Mrd. Jahre alte mikrofossile Bakterien und Cyanobakterien, welche Kohlendioxid „veratmeten“ wodurch Sauerstoff entstand [4]. Dieser reicherte sich zunächst im Meerwasser an und führte im Laufe von etwa 1 Mrd. Jahren zu riesigen Eisenoxidablagerungen auf dem Meeresboden, welche heute als Erzlagerstätten ausgebeutet werden. Der Sauerstoff begann aus dem Meer in die Atmosphäre auszugasen und bildete nach und nach eine immer oxidierender wirkende Atmosphäre.

Durch die harte UV-Strahlung der Sonne wurde der Sauerstoff zum Teil gespalten und bildete mit molekularem Sauerstoff das dreiatomige Ozon aus, was nun einen Teil der UV-Strahlung absorbierte. Dadurch wurde Leben außerhalb der Ozeane möglich.

Dieser eben beschriebene „Chemikalienmix“ (Atmosphäre, Minerale) bildete die Edukt-Grundlage für die Entstehung des Lebens. Die Frage nach der Bildung und den Reaktionsmöglichkeiten dieser „Basischemikalien“ ist also eine elementare Voraussetzung für die folgende Diskussion. Es gibt derzeit vier Theorien, wie Etappen des Lebens auf der Erde entstanden sein könnten.

2.1 Die Ursuppe

Im Jahr 1924 veröffentlichte der russische Biochemiker A. I. Oparin sein Buch „The Origin of Life“ [5, 6]. Unabhängig davon publizierte der englische Biologe J. B. S. Haldane [7] im Jahre 1928 ähnliche Überlegungen. Die Grundlage für die Theorie der beiden Wissenschaftler bildet eine reduzierende Uratmosphäre mit Bestandteilen wie Wasserdampf, Kohlendioxid und Ammoniak, die unter keinen Umständen Sauerstoff enthielt. Sie vermuteten, dass organische Verbindungen, wie Aminosäuren, Nukleinsäuren und Zucker aus Molekülen der Uratmosphäre entstanden sein könnten. Die für die Reaktionen benötigte Energie lieferten die noch ungefilterte harte UV-Strahlung, elektrische Entladungen und die noch hohen Temperaturen auf der Erdoberfläche. Durch die Anreicherung der entstandenen organischen Verbindungen im Urozean bildete sich die so genannte „Ursuppe“. Die Wissenschaftler gingen davon aus, dass sich die organischen Moleküle im Laufe der Zeit durch komplexe biochemische Reaktionen zusammengelagert haben und so erste primitive Organismen entstanden sind. Die Ursuppe soll dabei keinesfalls als „Kraftbrühe des Lebens“ verstanden werden. Die organischen Moleküle lagen bis auf lokale Ausnahmen, wie in austrocknenden Gewässern oder an Tonmineralien, nur in geringer Konzentration vor.

Schätzungen für den gesamten Ozean sprechen von weit unter einem Gramm organischer Moleküle auf einen Kubikmeter Wasser [8].

Etwa 25 Jahre später beschäftigten sich H. Urey und sein Doktorand S. Miller mit dieser Theorie und versuchten, sie durch Experimente zu stützen. S. Miller konstruierte eine geschlossene Apparatur, die aus zwei Glaskolben (0,5 L und 5 L) bestand, welche durch Glasrohre miteinander verbunden waren (Abb. 2). Im kleineren der beiden Kolben erhitzte er Wasser bis zum Sieden und leitete über ein Ventil Wasserstoff, Methan und Ammoniak in die Versuchsanordnung ein. Den entstehenden Wasserdampf trieb das Gasgemisch in den 5-Liter-Kolben, welcher mit zwei Wolfram-Elektroden ausgestattet war. Mit Hilfe dieser Elektroden wurden Funken-Entladungen induziert (erzeugten Temperaturen von bis zu 600°C), welche elektrische Entladungen in der frühen Erdgeschichte simulieren sollten. Durch anschließende Wasserkühlung kondensierte er das entstandene Gasgemisch und fing es auf. Nach einer Woche war die wässrige Lösung im Kolben tiefrot bis bräunlich gefärbt [9].

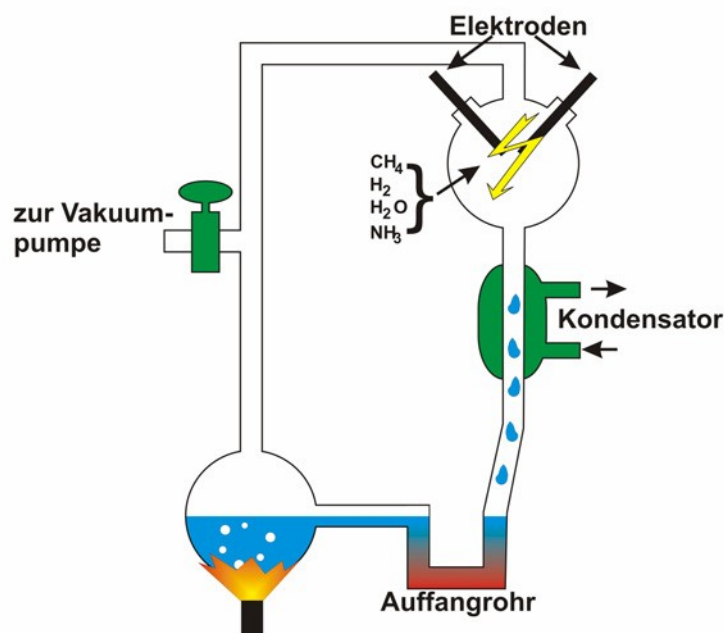


Abb. 2: Apparatur nach Miller

Die Analyse des erhaltenen Reaktionsgemisches zeigte wesentliche Komponenten belebter Materie, wie Aminosäuren, niedere Carbon- und Fettsäuren, Zucker, Purine, Porphyrine und Isoprene.

Obwohl Millers Experiment für die Beantwortung der Frage nach der Entstehung des Lebens auf der Erde eine große Rolle spielte, wurden seine und Urey's Annahmen über die Zusammensetzung der Uratmosphäre schon im Jahre 1966 in Frage gestellt.

Nach Ansicht der Kritiker konnte die Atmosphäre bedingt durch die harte UV- Strahlung nicht so reduzierend sein wie zuvor angenommen, da die vorherrschende UV-Strahlung Methan und Ammoniak im Laufe der Zeit photolytisch spalten musste und somit Kohlendioxid (CO_2), Stickstoff (N_2) und Wasser (H_2O) entstanden. Diese Zusammensetzung ist aber deutlich schlechter zur Synthese von Biomolekülen geeignet. Urey kam jedoch zu dem Schluss, dass die vorhandene UV-Strahlung zu einer photolytischen Spaltung des Wasserdampfes führte, sich der entstandene Wasserstoff ins Weltall verflüchtigte und der Sauerstoff in der Atmosphäre als eine geringe Ozonschicht verblieb. Berechnungen von Berkner und Marshall (Universität Texas) [1] ergaben, dass sich dadurch 0,1 % des heutigen Gehalts an Sauerstoff in der Atmosphäre befunden haben mussten. Die minimale Ozonschicht absorbierte die kurzwellige, energiereiche UV(B)-Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 Nanometern. Aminosäuren sind aber genau bei diesen Wellenlängen empfindlich gegen UV-Strahlung und wurden demzufolge nicht mehr zerstört, konnten so vom Regen in die Ozeane gespült werden und waren in den tieferen Wasserschichten vollends vor der Strahlung geschützt. Dieses Phänomen wurde folglich Urey-Effekt genannt. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die kurzwellige UV-Strahlung zu Veränderungen an Aminosäuresequenzen geführt haben könnte und somit erste Mutationen auftraten.

Als Alternative dazu werden Reaktionen mit Blausäure und Wasser vorgeschlagen, die ebenfalls zu Aminosäuren führen können. Dabei könnte die Blausäure aus den atmosphärischen Gasen Kohlendioxid, Kohlenmonoxid, Stickstoff und Wasserdampf unter dem Einfluss der UV-Strahlung der Sonne gebildet worden sein [10].

Miller optimierte im Laufe der Jahre seine Reaktionsbedingungen und Analysemethoden [11]. Er konnte nicht nur seine ersten Ergebnisse bestätigen, sondern auch noch weitere Verbindungen identifizieren (Tab. 1).

identifizierte Verbindungen	Anteil im Gemisch
Teer	85 %
Carbonsäuren	13 %
Glycin	1,05 %
Alanin	0,85 %
Glutaminsäure	Spuren
Asparaginsäure	Spuren
Valin	Spuren
Leucin	Spuren
Serin	Spuren
Prolin	Spuren
Threonin	Spuren

Tab. 1: Ergebnisse der Miller-Experimente – quantitative Auflistung der Produkte

Millers Versuche legten den Grundstein für eine Reihe ähnlicher Untersuchungen anderer Wissenschaftler mit einer veränderten Zusammensetzung der Atmosphäre. Auch andere Energiequellen wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Wärme und Schockwellen wurden verwendet und führten durchaus zu den gleichen organischen Produkten, wenn auch mit unterschiedlichen Ausbeuten [11, 12].

2.2 Grundbausteine des Lebens aus dem Weltall?

Im Jahre 1906 verkündete der schwedische Physikochemiker S. Arrhenius, dass das Leben extraterrestrischen Ursprungs sei [13, 14].

In Meteoriten und Kometen konnten mit den heute gängigen Möglichkeiten zahlreiche organische Verbindungen identifiziert werden. So wurden im Kern des HALLEY'schen Kometen Staubpartikel gefunden, die etwa 14 % organischen Kohlenstoff enthielten (Meteoriten enthalten bis zu 5 % organisches Material). Unter anderem wurden Verbindungen wie Blausäure und Formaldehyd gefunden. Massenspektrometrische Analysen der Staubpartikel von Kometen zeigten außerdem Purine und Pyrimidine sowie Formaldehyd-Polymere, Ammoniak, Acetylen, Methylen und Acetonitril. Ein drei Kilometer großer Komet enthält ungefähr 10^{27} Staubteilchen, die durch kosmisches Eis zusammengehalten werden [15, 16].

Laut AMES-Forschungsinstitut der NASA hat kosmisches Eis im Unterschied zu normalem Wassereis keine geordnete Kristallgitterstruktur. Durch diese Struktur ist es möglich, Fremdstoffe wie organische Moleküle, welche im kosmischen Eis eingeschlossen sind, durch das Weltall zu befördern. Um die amorphe Form von Wassereis zu erhalten, bedarf es der Zufuhr von Energie, wozu die Wissenschaftler im Labor den Beschuss mit Elektronen nutzten. Im Weltall liefert die harte UV-Strahlung die notwendige Energie um das Eis in seine amorphe Form (bei 200 bis 150 Kelvin stabil) umzuwandeln [16, 17, 18]. Beim Eintritt in die Erdatmosphäre erwärmen sich die Kometen. Dabei verändert sich die Struktur des kosmischen Eises zu einer starren, geordneten Kristallstruktur, und das im Eis enthaltene organische Material wird schlagartig freigesetzt, fällt auf die Erde nieder und konnte sich so im Ozean anreichern. Der kometare Staub enthält sämtliche Grundbausteine biologisch wichtiger Moleküle in Form energiereicher, instabiler Vorstufen von Biomolekülen, die beim Kontakt mit Wasser zu reagieren beginnen. So reagieren die im Staub enthaltenen Nitrile zu Fettsäuren, die sich im Wasser eng an das Staubkorn anlagern und Micellen ausbilden. Solche Micellen könnten als abgetrennte

Reaktionsräume dienen, in denen aus einfachen Molekülen komplexere Strukturen entstanden sein könnten.

2.3 Lebensentstehung unter Tiefsee-Bedingungen

In heißen Springquellen, wie Geysiren und Schwefelquellen im Yellowstone-Nationalpark, wurden anaerob lebenden Mikroorganismen vom Stamm der Thermoacidophilen entdeckt. Dieser Fund stützt die Theorie der Entstehung des Lebens in der Ursuppe. In Geysiren herrschen Temperaturen von 90°C und ein schwefelsaures Milieu. Trotz der lebensfeindlichen Bedingungen fand man in dieser Umgebung den Bakterienstamm *Sulfolobus* der zu den Archaeobakterien zählt. Diese stellen aus Schwefel in den vulkanischen Dämpfen und Luftsauerstoff Schwefelsäure her [19].

Im Jahre 1977 wurden entlang des mittelozeanischen Rückens in 2500 m Tiefe unterseeische hydrothermale Schlote die „black smoker“ entdeckt. In dieser Tiefe herrscht ewige Nacht und ein Druck, der das 300-fache des Atmosphärendruckes beträgt.

Durch Risse und Spalten in der Erdkruste dringt kaltes Meerwasser in die Basaltschicht ein. Auf Grund des heißen geschmolzenen Gesteins im Erdinneren erhitzt sich das Wasser auf 350°C und löst Metalle (vor allem Eisen), Schwefel und Spurenelemente aus dem umgebenden Gestein. Beim Austreten trifft das heiße, mit Mineralien angereicherte Wasser auf das kalte Ozeanwasser. Dadurch bilden sich dunkle Niederschläge von Polymetallsulfiden und -anhydriten (Fe(II)-, Cu(II)-, Mn(II)-, Zn(II)-, u.a.), welche sich am Rand der Schlote ablagern und poröse Gesteinsstrukturen aufbauen (Abb. 3). Diese Metallionen sind ebenfalls als aktive Zentren zahlreicher Metalloenzyme zu finden.

Metallsulfide können die Synthese einfacher Moleküle zu komplexen Strukturen katalysieren, die zu größeren Biomolekülen, wie Nucleotiden, Proteinoiden und Lipiden weiterreagieren konnten.

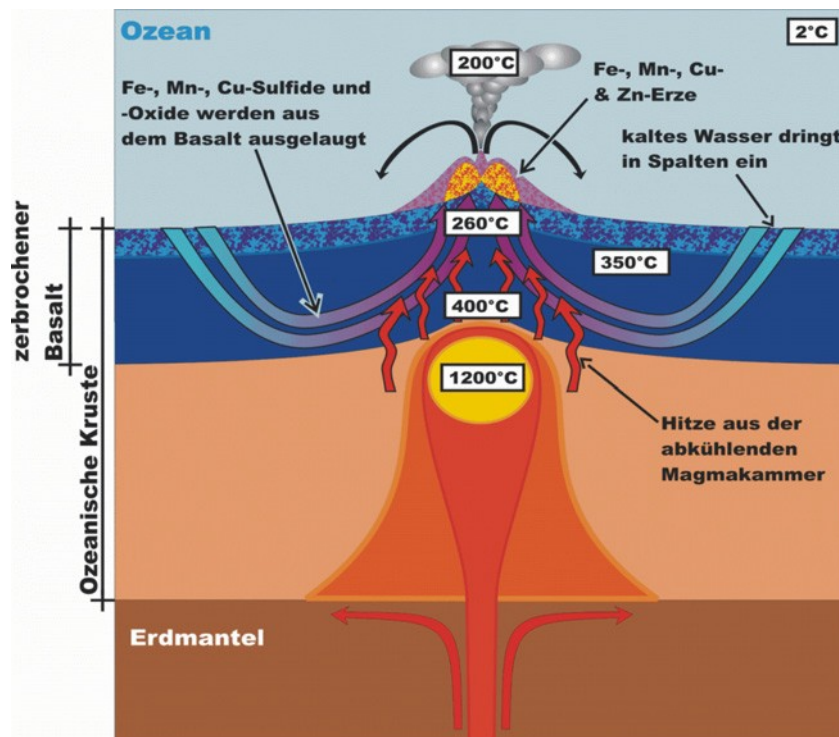


Abb. 3: Hydrothermaler Schlot "black smoker" (nach: Understanding Earth von Frank Press und Raymond Siever © 1994, 1998, W. H. Freeman and Company)

Auch in unmittelbarer Umgebung dieser Schlote wurde Archaeobakterien gefunden. Diese sind an die an den Schlotten herrschenden extremen Bedingungen perfekt angepasst und leben anaerob, extrem thermophil, teilweise bei Temperaturen von mehr als 100°C und bei pH-Werten von 2 bis 11. Die Bakterien oxidieren die oben erwähnten Metallsulfide und setzen dabei Energie frei, welche sie zum Aufbau von Biomasse aus Kohlendioxid verwenden. In Analogie zur Photosynthese wird dieser Prozess auch als Chemosynthese bezeichnet.

Neben Bakterien fand man in der Umgebung der Schwarzen Raucher eine Vielzahl bisher unbekannter Meereslebewesen unter Anderem meterlange Würmer, riesige Kolonien weißer Krabben und blinder Garnelen, ungewöhnlich große Muscheln und Krebse. Die Bakterien dienen für einige dieser Lebewesen, z.B. die Garnelen, als Nahrung. Andere, wie die Muscheln unterhalten symbiotische Beziehungen mit den

Bakterien, die in deren Kiemen leben. Die Muscheln liefern den Bakterien ständig sulfidhaltiges Wasser und im Gegenzug erhalten die Muscheln Nährstoffe von den Bakterien [20].

Diese Entdeckungen führten zu der Erkenntnis, dass sich möglicherweise erstes Leben unter genau solchen Bedingungen unter Sauerstoffausschluss, praktisch im gesamten Urozean gebildet haben muss und später durch die aerob lebenden Bakterien in die Regionen der schwarzen Raucher oder Geysire verdrängt wurde.

2.4 Chemoautotropher Ursprung des Lebens

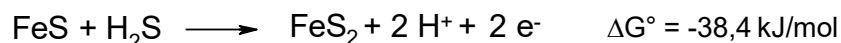
Archaeobakterien sind chemoautotroph lebende Bakterien, die ihre Energie aus der Oxidation des Schwefelwasserstoffs gewinnen und Kohlendioxid zu organischen Verbindungen reduzieren.

Die Theorie vom chemoautotrophen Ursprung des Lebens wurde von G. Wächtershäuser in zahlreichen Schriften vertreten [21, 22, 23]. Dabei ging er von einer Uratmosphäre aus, die lediglich Kohlendioxid, Stickstoff und Wasser mit Spuren von Wasserstoff enthielt. Die Energiequelle für einen chemoautotrophen Ursprung des Lebens müsse nach der Meinung von Wächtershäuser sechs Bedingungen erfüllen [24]:

1. Es muss ein Reduktionsmittel geben. Die Kohlenstoff-Oxidationsstufe des ersten chemoautotroph lebenden Organismus muss zwischen der maximal möglichen Oxidationsstufe von Kohlendioxid (C^{4+}) und der minimalen Oxidationsstufe von Methan (C^{-4}) liegen.
2. Das Redoxpotenzial muss für alle Reduktionsreaktionen des Metabolismus ausreichen.
3. Der Elektronenfluss muss vom Reduktionsmittel direkt und geradlinig zu den organischen Verbindungen verlaufen, weil eine Energiekopplung noch nicht existieren kann.

4. Der Energiefluss muss in der Abwesenheit eines Metabolismus ein wenig gehemmt sein. Andernfalls kann kein hohes chemisches Potenzial aufgebaut und durch den Metabolismus genutzt werden.
5. Die Energiequelle muss innerhalb des Organismus wirksam sein, weil das Reduktionsmittel an einigen Schritten im Metabolismus arbeiten muss. Folglich muss es mild und selektiv sein. Das schließt z.B. UV-Licht aus.
6. Die Energiequelle muss geochemisch plausibel sein.

Das Problem des chemoautotrophen Ursprungs liegt darin, dass keines der verwendeten Reduktionsmittel der vorhandenen Organismen alle der sechs Bedingungen erfüllt [21]. So postuliert Wächtershäuser, dass die Energiequelle des chemoautotrophen Ursprungs in der oxidativen Bildung von Pyrit nach folgender Gleichung liegen muss.



Gl. 2

Mineralien wie Pyrit, andere Metallsulfide und Montmorillonite vermögen es, organische Substanzen in ihren Poren zu binden. In diesen Poren könnte es nun zu einer Aufkonzentrierung des organischen Materials gekommen sein.

Der goldfarbene glänzende Pyrit weist Halbleitereigenschaften auf. Freie Ladungsträger auf der Oberfläche führen zu elektrostatischen Wechselwirkungen, wodurch organische Substanzen leicht adsorbiert werden und auf dem Trägermaterial einen „organischen Film“ ausbilden. Zusätzlich können die katalytischen Eigenschaften des Pyrits verschiedene chemische Umsetzungen begünstigen. Der Biochemiker K. O. Stetter ist davon überzeugt, dass sich auf der Pyritoberfläche möglicherweise Mikrosphären ansiedeln [1]. Mikrosphären (Abb. 4, Abb. 5) sind kleine kugelige Proteinoid-Strukturen, von etwa zwei Tausendstel Millimeter Durchmesser, welche zellartige Membrane aufwiesen. Organische Kleinmoleküle, wie ATP, Glucose und andere Substanzen aus der Umgebung könnten durch die Protein-Membranen ins Innere der Mikrosphäre

geschleust worden sein, haben sich dort angereichert, wurden anschließend von Pyritkriställchen adsorbiert und durch die hohen Temperaturen und Drücke in der Tiefsee zu Enzymen, Proteinen und vielleicht Nucleinsäuren konvertiert. Mikrosphären sind in der Lage zu wachsen und sich durch Knospung zu „vermehren“. Hinzu kommt die erstaunliche Ähnlichkeit mit analogen Befunden in 3,8 Mrd. Jahre alten Fossilien in zu Stein gewordenen Meeressedimenten, die man in Grönland fand.

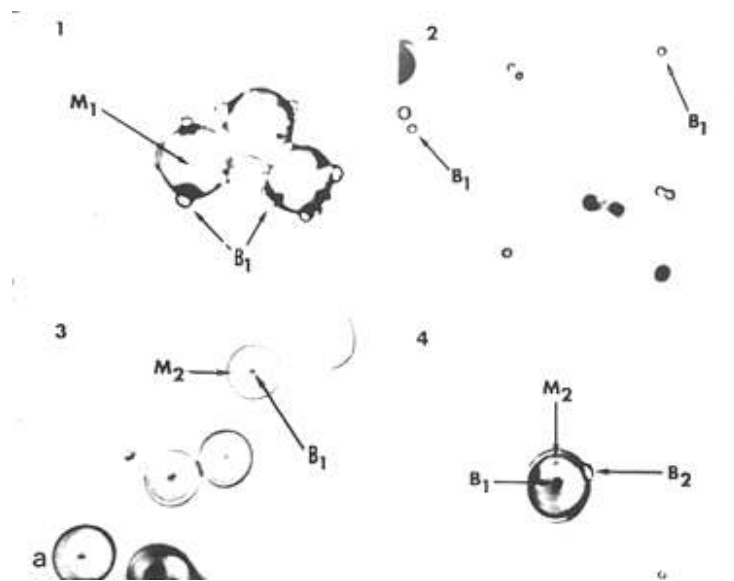


Abb. 4: Aufnahmen von Mikrosphären aus Protenoiden

Sobald eine Mikrosphäre (M₁) eine bestimmte Größe erreicht hat (1), bildet sie Knospen (B₁), die sich abgliedern (2). Jede von ihnen ist Ausgangspunkt der Bildung einer neuen Mikrosphäregeneration (M₂) (3), die sich ihrerseits wieder durch Knospung reproduziert (4)

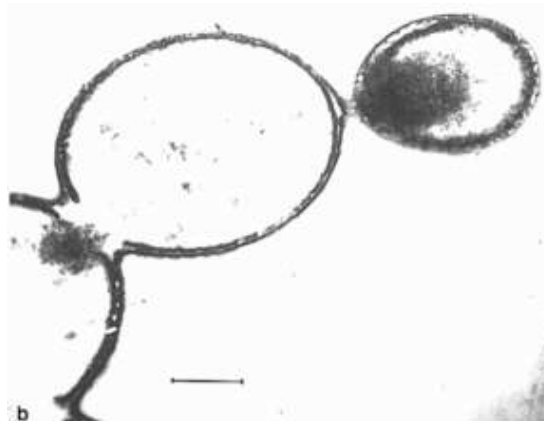


Abb.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine knospende Mikrosphäre [25,26]

Auch Stetter glaubte, dass einfache Mikroorganismen Pyrit als Energiequelle genutzt haben könnten. Den bei der Reaktion entstandenen Wasserstoff könnten Bakterien zur Energiegewinnung genutzt haben. Die Theorie ist plausibel, bleibt aber zu beweisen.

Wächtershäuser suchte nach einem Syntheseweg, wodurch man Kohlendioxid in Form einer organischen Verbindung autokatalytisch binden kann. Er entwarf den Plan eines „präbiotischen Citronensäurezyklus“ (Abb. 7), der sich vom bestehenden reduktiven Citronensäurezyklus (Abb. 6) wie folgt unterscheidet [23]:

- Zwischen der Carboxylat-Gruppe und der Thiocarboxylat-Gruppe besteht ein Gleichgewicht.
- Die Verbindungen mit Carbonyl-Gruppen kommen neben entsprechenden Thioverbindungen vor.
- Die Dehydratisierungs-Hydratisierungs-Gleichgewichte von cis-Aconitat und Fumarat kommen in Konkurrenz mit der Additionsreaktion von H_2S vor.
- Die positiv geladene Oberfläche der Pyritkristalle oder katalytischer Schwermetallsulfide bindet die anionischen organischen Bestandteile des archaischen Zyklus über ihre anionischen Carboxylat-, Thiocarboxylat- oder Thiolate-Gruppen. Dieses Modell ist als „theory of surface metabolism“ bekannt. Statt NADPH dienen Schwefelwasserstoff und Eisensulfid als

Reduktionsäquivalente. Die chemische Energiequelle bildet Schwefelwasserstoff und nicht Adenosintriphosphat.

- Die an die Pyritoberfläche gebundenen organischen Bestandteile entwickeln einen nichtenzymatischen Oberflächenmetabolismus, in welchem alle an der Oberfläche gebundenen Produkte wiederum Bestandteil weiterer Reaktionen sind, die in einem ständigen Kreislauf ablaufen.
- In dem archaischen Oberflächenmetabolismus ist für die Spaltung das Aldol-Retroaldol-Gleichgewicht der oberflächengebundenen Thioform des Citrates weniger bevorzugt als in dem korrespondierenden Lösungsgleichgewicht.

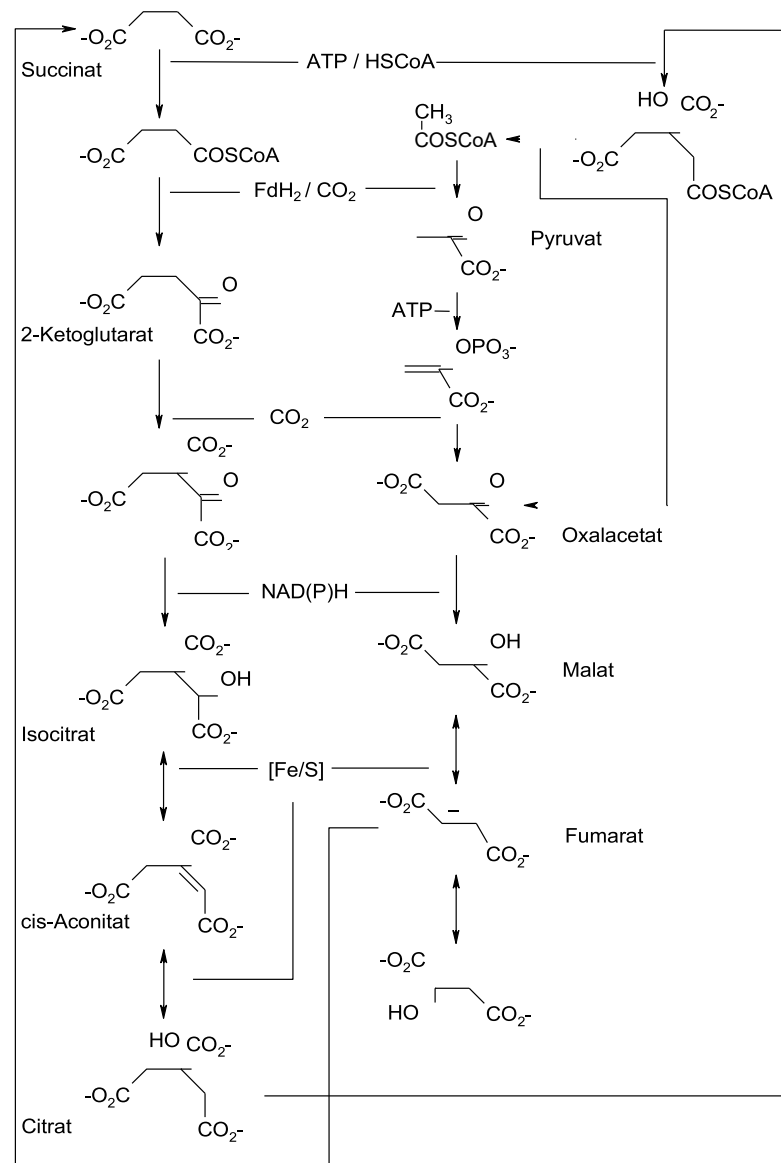


Abb. 6: Citronensäurezyklus

Im Gegensatz zum Citronensäurezyklus, in dem ausschließlich Verbindungen mit Hydroxyl- bzw. Carbonyl-Gruppen vorkommen, existieren in dem von Wächtershäuser vorgeschlagenen „präbiotischen Citronensäurezyklus“ zusätzlich Verbindungen mit Thio-Gruppen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass im Citronensäurezyklus die Katalyse der Umwandlung von Fumarat in Succinat und Isocitrat in Citrat durch so genannte Eisen-

Schwefel-Proteine erfolgt, deren reaktives Zentrum aus ein bis vier Eisenatomen besteht, die untereinander zum Teil über Schwefelatome verknüpft und über Cystein an das Protein gebunden sind. Beim Ablauf dieses *proposed archaic citric acid cycle* wird, genau wie beim „reduktiven“ Citronensäurezyklus, aus einem Molekül Succinat und vier Molekülen Kohlendioxid ein weiteres Molekül Succinat gebildet.

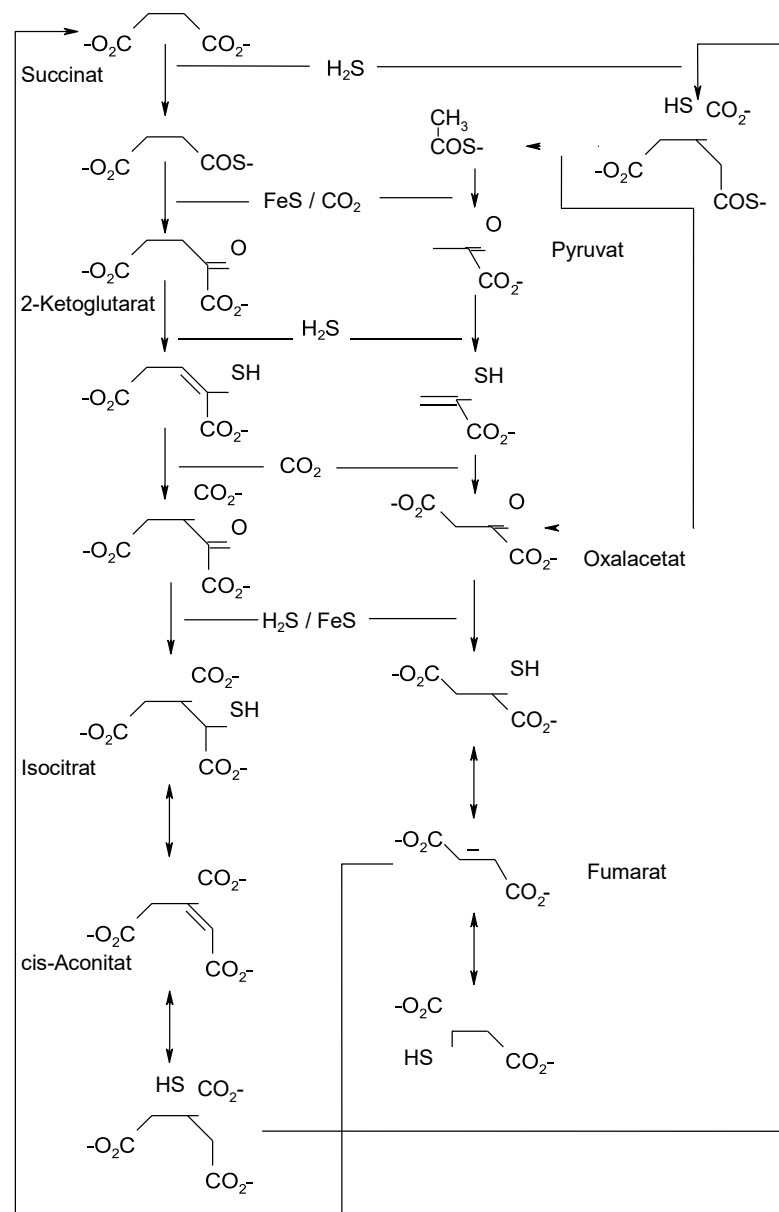


Abb. 7: Präbiotischer Citronensäurezyklus

Der Zyklus ist somit autokatalytisch und verläuft nicht enzymatisch katalysiert. Während des Durchlaufens dieses Reaktionszykluses finden Nebenreaktionen statt, wodurch lange Ketten von fettsäureähnlichen Molekülen entstehen, die an der positiv geladenen Pyritoberfläche gebunden werden können. Solche Moleküle befinden sich teilweise auch in der Membran von thermophilen Archaeobakterien. An der Pyritoberfläche kommt es somit zur Ausbildung einer lipophilen, organischen Hülle. Im Laufe der Evolution bildeten sich organische Verbindungen, die in der Lage waren, die verschiedenen Reaktionen besser zu katalysieren als die Pyritoberfläche. Die Membran, die sich auf dem Pyritkristall gebildet hatte, löste sich schließlich ab und bildete, mit katalytischen Kristallen und Vorstufen der späteren Enzyme im Inneren, die erste Zelle [23, 27].

3. Aktivierung/ Fixierung kleiner Moleküle

Eiweiße und Nucleinsäuren sind Grundbausteine des Lebens und enthalten vor allem die Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Stickstoff in verschiedenen Kombinationen. Ohne die funktionierenden Stoffkreisläufe dieser Elemente wäre auf der Erde kein Leben möglich.

3.1 Kohlenstoff-Fixierung

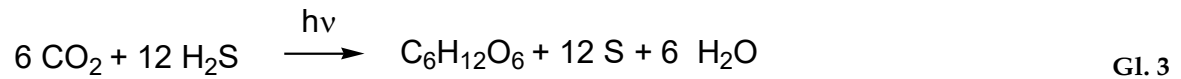
Der Hauptteil des Kohlenstoffs liegt als Carbonat in der Lithosphäre vor. In der Atmosphäre macht Kohlenstoff als Kohlendioxid ca. 0,03 Volumenprozent aus, wobei die Konzentration seit 1950 durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe (Kohle, Erdöl, Erdgas) stetig ansteigt, d.h. der Kohlenstoff-Kreislauf ist hauptsächlich ein Kohlendioxid-Kreislauf

3.1.1 Natürliche Kohlenstoff-Fixierung (Photosynthese)

Als Photosynthese bezeichnet man allgemein den Aufbau von höherenergetischen organischen Verbindungen aus energiearmen Ausgangsstoffen unter Ausnutzung der Sonnenenergie durch Lebewesen. Man unterscheidet anoxygene und oxygene Photosynthese.

Anoxygene (bakterielle) Photosynthese findet man bei anaerob lebenden Bakterien der Ordnung *Rhodospirillales* (Schwefelbakterien: Schwefelpurpurbakterien und Grüne Schwefelbakterien), die in der Nähe von Vulkanen vorkommen. Deren Photosyntheseapparat besitzt lediglich ein Photosystem. Als Elektronenquelle dient

Schwefelwasserstoff, welcher zu Schwefel und Wasserstoff oxidiert wird und für den Aufbau von Kohlenhydraten durch Kohlendioxidreduktion nötig ist (Gl. 3).



Bei dieser Form der Photosynthese gibt es naturgemäß keine Wasserspaltung und somit wird Schwefel anstelle von Sauerstoff gebildet.

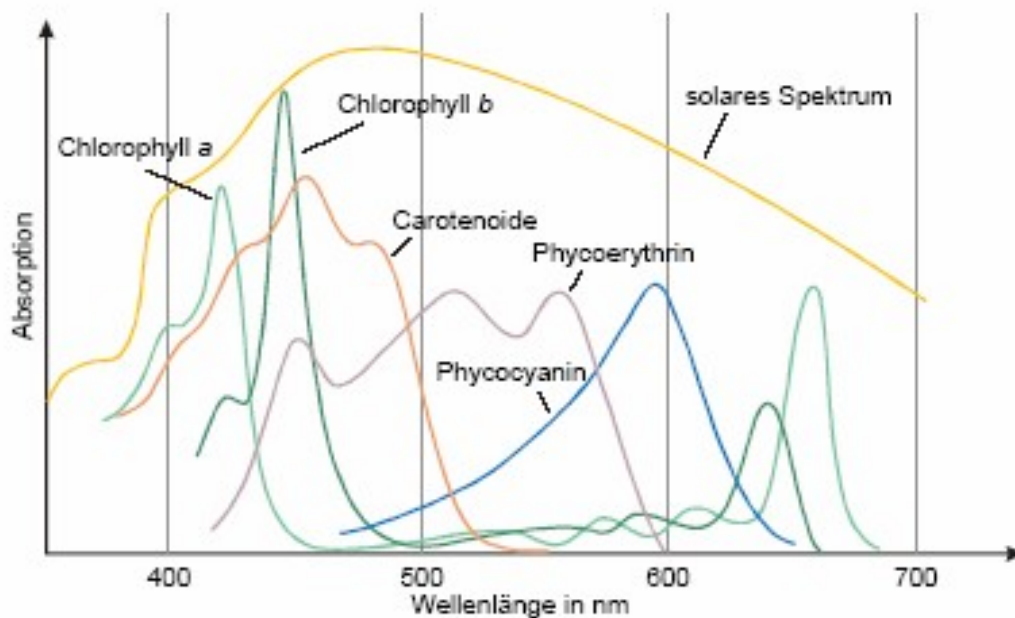


Abb. 8: Absorptionsspektren verschiedener photosynthetischer Pigmente

Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae*) sind an ihrer rot-braunen Färbung und den intrazellulären Schwefelablagerungen zu erkennen. Sie enthalten neben speziellen, tiefroten oder rot-braunen Carotinoiden (Absorption 400-550 nm, der Lichtanteil, der auch in tiefere Wasserschichten vordringt!) Bacteriochlorophyll a und b, das im roten und infraroten Spektralbereich (800-1040 nm) absorbiert (Abb. 8).

Grüne Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*, *Chloroflexaceae*) enthalten die Bacteriochlorophylle a, c, d und e (Absorption 700-760 nm) und erscheinen dadurch gelblich-grün oder, je nach Carotinoid-Ausstattung, grün-braun. Sie lagern Schwefel extrazellulär ab. Während *Chlorobiaceae* obligat phototroph sind und ausschließlich H₂S und Schwefel nutzen, können *Chloroflexaceae* auch organische Elektronendonatoren nutzen („photoorganotroph“) oder organische Substrate direkt verwerten („chemoorganotroph“).

Nicht immer resultieren anaerobe Prozesse im Süßwasser aus starker H₂S-Bildung. Bei geringen H₂S-Konzentrationen kommen schwefelfreie Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*) zur Vermehrung. Sie haben ähnliche Pigmente und Photosysteme wie die Schwefelpurpurbakterien, verwenden aber organische Elektronendonatoren, H₂ oder Spuren von H₂S (höhere Konzentrationen sind toxisch) für die Photosynthese. Außerdem können sie auch aerob und chemoorganotroph wachsen.

Außer durch phototrophe Bakterien kann H₂S auch durch farblose Schwefelbakterien mit Hilfe von Sauerstoff zu Schwefel und weiter zu Sulfat oxidiert werden. Diese Bakterien benutzen H₂S oder Schwefel als Elektronendonator (Energiequelle) und fixieren CO₂ als C-Quelle; ihre Lebensweise ist also chemolithoautotroph. Viele Arten lagern Schwefel intrazellulär ab und erscheinen dadurch weiß. Oft findet man auf H₂S-freisetzenden Sedimenten einen weißlichen Überzug aus fädigen (*Beggiatoa*, *Thiotrix*) und einzelligen (*Achromatium*, *Thiovolum*) Schwefelbakterien.

Im anaeroben Hypolimnion und Sediment kann – bei ausreichenden Sulfatkonzentrationen – die dissimilatorische Sulfatreduktion eine wichtige Rolle spielen.

Dabei wird Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor für die Oxidation organischer Substanzen (z.B. organische Säuren, Alkohole, Aromaten u.ä.) benutzt und zu Sulfid reduziert. Sulfatreduzierende Bakterien (z.B. *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfo*- etc.) sind meist strikt anaerob, Sauerstoff wirkt stark hemmend. Besonders wichtig ist die Sulfatreduktion für die Mineralisierung in maritimen Sedimenten (wegen der hohen Sulfatkonzentration im Meerwasser), aber auch an Süßwasserstandorten sind sulfidogene Sedimente nicht selten. Die Sulfatreduktion steht hier allerdings in stärkerer Konkurrenz zur Methanogenese [28].

Erst die höher entwickelten prokaryontischen Cyanobakterien (Blaualgen) optimierten die Photosynthese und konnten mit Hilfe von Lichtenergie Wasser spalten

Abb. 9). Der dabei frei werdende molekulare Sauerstoff veränderte die Zusammensetzung der Erdatmosphäre.

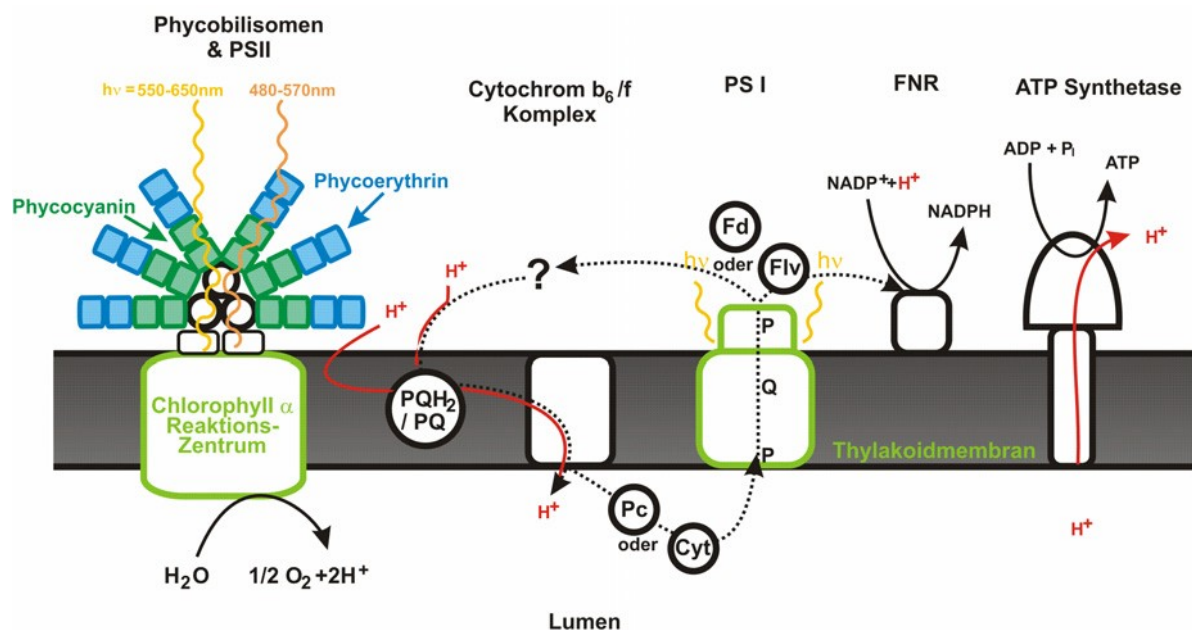


Abb. 9: Schematischer Überblick über die cyanobakterielle Photosynthese

Der photosynthetische Elektronentransport in Cyanobakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen und Algen ist in den Thylakoidmembranen lokalisiert und besteht aus integralen und peripheren Proteinen, an die Pigmente und redoxaktive prosthetische Gruppen gebunden sind.

An der oxygenen Photosynthese sind neben vier membranständigen Proteinkomplexen, auch verschiedene kleinere Elektronentransportproteine beteiligt. Der Netto-Elektronenfluss wird hier mit gestrichelten Linien angezeigt und verläuft von links nach rechts.

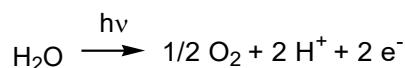
In den Reaktionszentren der Photosysteme PS II und PS I findet die photoinduzierte Ladungstrennung statt, wobei Elektronen durch die Photosynthesemembran

transportiert werden können. Meistens ist der Elektronentransport an einen Protonentransport gekoppelt, durch den über die Membran ein elektrochemisches Potential aufgebaut wird.

Die Oxidation von Wasser ersetzt das fehlende Elektron des P^+ im PS II. Es erfolgt eine Abgabe von Protonen ins Lumen und des bei der Reaktion entstandenen molekularen Sauerstoffs als Nebenprodukt. Im PS I hingegen wird das fehlende Elektron vom Plastocyanin (PC) oder Cytochrom c_6 (cyt) ersetzt, die über den Cytochrom b_6/f - Komplex und den Plastochinon / Plastochinol-Pool, indirekt vom PS II reduziert werden. An der stromalen Seite des PS I werden die löslichen Transportproteine Ferredoxin (Fd) oder Flavodoxin (Flv) reduziert, die ihre Reduktionspotenziale an die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) übertragen. Diese katalysiert daraufhin die Reduktion des NADP⁺ zu NADPH. Durch die eingezeichneten Reaktionen kommt es zu einer erhöhten Protonenkonzentration (durchgezogene Pfeile) im Lumen. Der resultierende Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP genutzt.

Als zusätzliche Lichtsammelsysteme neben dem PS II und PS I besitzen die Cyanobakterien die Phycobilisomen.

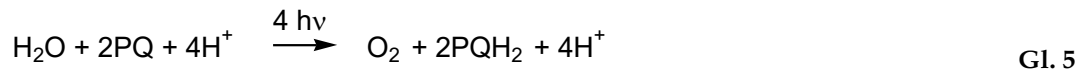
Unter physiologischen Bedingungen sind PS I und PS II elektrochemisch in Serie geschaltet. In einem ersten Schritt wird das PS II photochemisch durch einen Lichtquanten angeregt, was zu einer Ladungstrennung führt. Das stark positive Redoxpotenzial des oxidierten primären Elektronendonors, P680, wird auf einen vier Manganatome enthaltenden Komplex des PS II [29] übertragen, in dem einzelnen Wassermolekülen schrittweise Elektronen entzogen werden. Dies führt zur Freisetzung von Protonen und molekularem Sauerstoff an der lumenalen Seite des PS II:



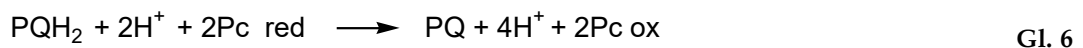
Gl. 4

Bei der genannten Ladungstrennung kommt es zur Reduktion eines primären Elektronenakzeptors. Über weitere Elektronenakzeptoren gelangt das Elektron auf ein Plastochinonmolekül (PQ, im PS II allgemein QA), das nahe der äußeren oder stromalen

Seite der Thylakoidmembran vom PS II gebunden wird. Das PQ nimmt nach einer zweiten Ladungstrennung noch ein weiteres Elektron auf und verlässt, nach doppelter Protonierung als neutrales Plastochinol (PQH_2) seine Bindungsstelle und diffundiert in die umgebende Lipidschicht. Die vom PSII katalysierte Reaktion ist demnach:



Durch die Membran diffundierend, trifft das PQH_2 auf den Cytochrom b_6/f -Komplex (Cyt b_6/f) und wird hier reoxidiert. Das Plastochinolmolekül reduziert über den Cyt b_6/f -Komplex zwei Plastocyaninmoleküle (Pc). Nach dem Modell des modifizierten Q-Zyklus werden dabei insgesamt vier Protonen in das Lumen abgegeben



(in Cyanobakterien kommt Pc [z.B. bei Eisenmangel] lediglich als Alternative zu Cytochrom c_6 zum Einsatz; 'red' und 'ox' stehen für reduzierte und oxidierte Formen der Elektronentransferproteine).

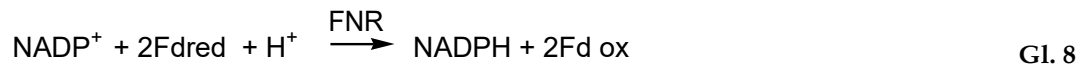
Wie das PS II überträgt auch das PS I lichtabhängig Elektronen von der lumenalen auf die stromale Seite der Thylakoidmembran. Jedoch unterscheidet sich das PS I vom PS II zum einen dadurch, dass sein primärer Elektronendonator P700 nach der Lichtanregung ein erheblich stärkeres Reduktionsmittel darstellt als P680 im PS II. Als Folge davon kann PS I an seiner stromalen Seite lösliche Elektronentransport-Moleküle reduzieren: Fe_2S_2 -Ferredoxin (auch 'pflanzliches' Ferredoxin genannt) oder das bei Eisenmangel produzierte Flavinprotein Flavodoxin. Zum anderen oxidiert das PS I kein Wasser. Statt dessen bezieht es die Elektronen zur Rereduktion seines oxidierten primären Elektronendonors von löslichen Transportproteinen wie Pc oder Cyt c_6 , die zuvor vom Cyt b_6/f -Komplex reduziert worden sind.

Makroskopisch gesehen lässt sich die von PS I katalysierte Reaktion folgendermaßen zusammenfassen:



(wieder kann Pc durch Cyt c 6 ersetzt werden; 'Fd' hingegen steht gleichermaßen für Ferredoxin [Fdx] und Flavodoxin [Fld]).

Die vom PS I reduzierten Proteine Ferredoxin oder Flavodoxin reduzieren ihrerseits mittelbar NADP^+ zu NADPH. Die Reduktion wird von der Ferredoxin: NADP^+ - Reduktase (FNR) katalysiert.

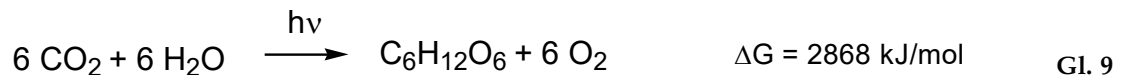


Da es sich bei den Thylakoiden um geschlossene Vesikel handelt, kommt es durch die Wirkung des PS II und des Cyt b6/f-Komplexes zu einer zunehmenden Ansäuerung des eingeschlossenen Lumens. (Die Protonen können aufgrund ihrer Ladung nur schlecht durch die Membran hindurch diffundieren). Die Energie, die in Form eines über die Thylakoidmembran ausgebildeten elektrochemischen Potentialgradienten vorliegt, wird von dem vierten membranständigen Komplex der Photosynthese, der ATP-Synthetase, genutzt, um ADP und anorganisches Phosphat (Pi) zu ATP umzusetzen.

Unter bestimmten Stresssituationen - in untergeordnetem Maße auch unter physiologischen Bedingungen - kann PS I [30] und möglicherweise auch PS II [31] unabhängig vom jeweils anderen Photosystem einen minimalen Elektronentransport aufrechterhalten und damit den Energiebedarf einer Zelle kurzfristig decken. Diese Prozesse sind jedoch noch nicht vollkommen aufgeklärt. Beim 'zyklischen Elektronentransport', an dem das PSI und der Cyt b6/f-Komplex beteiligt sind, ist beispielsweise bis heute unbekannt, wie der Elektronenkreislauf zwischen dem PS I und dem Cyt b6/f-Komplex zustande kommt bzw. es fehlt der eindeutige Nachweis einer Ferredoxin: Plastochinon- Oxidoreduktase (in Abbildung 1-1 durch ein '?' gekennzeichnet) [32].

Die oxygene (pflanzliche) Photosynthese ist für das Leben auf der Erde von globaler Bedeutung:

- Mit Hilfe der Sonnenenergie werden Kohlendioxid und Wasser zu organischen Stoffen (Zucker, Stärke, Zellulose) und Sauerstoff umgewandelt (Gl. 9).



- Durch die Bildung der sauerstoffhaltigen Atmosphäre werden die sehr effektive oxidative Verbrennung von Nährstoffen und so der Aufbau hochkomplexer heterotropher Lebewesen ermöglicht.
- Die sich infolge der sauerstoffhaltigen Atmosphäre bildende Ozonschicht wirkte als UV-Filter und ermöglichte damit erst die Entstehung höheren Lebens.

Der Gesamtvorgang der oxygenen Photosynthese läuft in zwei Teilprozessen ab, der Lichtreaktion und der darauf folgenden Dunkelreaktion. Während der Lichtreaktion erfolgen die Lichtabsorption und die Umwandlung dieser Energie in die Energieäquivalente ATP und NADPH. Während der Dunkelreaktion werden die energiereichen Produkte der Lichtreaktion eingesetzt, um aus Kohlendioxid Glucose aufzubauen.

Auf diese Weise werden global jährlich etwa 3×10^{18} kJ an biochemischer Energie erzeugt, die zur Fixierung von 2×10^{11} t Kohlenstoff genutzt wird. Diese fixierte Energie und der produzierte Sauerstoff stellten vor Mrd. Jahren die Grundlage zur Entwicklung der aerob lebenden Organismen dar und sind noch heute die unbedingte Basis für die Existenz des Menschen und anderer Lebewesen.

Diese grundlegende Bedeutung erklärt das wissenschaftliche Interesse an den biochemischen Prozessen der Photosynthese [33].

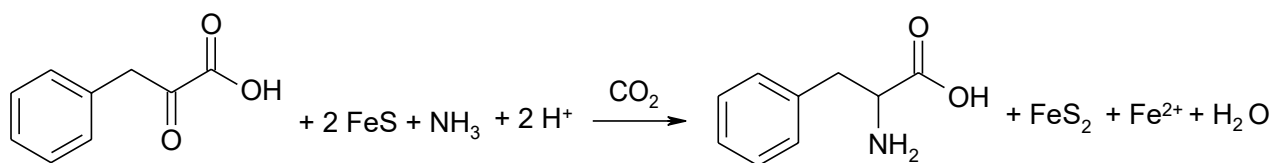
3.1.2 Anthropogene Kohlenstoff-Fixierung

Der Sonderforschungsbereich 436 mit dem Titel „Metallvermittelte Reaktionen nach dem Vorbild der Natur“ der Friedrich-Schiller-Universität Jena beschäftigt sich unter anderem mit der Fixierung und Aktivierung von Kohlendioxid an verschiedenen Metallzentren. So ist es Walther et al. gelungen, einen Komplex aus der Ru/Mn-Reihe mit einem lichtaktiven Komplexrumpf herzustellen, der in der Lage ist, Kohlendioxid reversibel zu fixieren. Dabei lassen sich Kohlendioxid-Fixierung und -Eliminierung über mehrere Zyklen wiederholen. Ferner wurde ein neuartiges reversibles Kohlendioxid-Speichersystem aufgebaut, in dem sechs Nickel(II)-Zentren über Carbamatbrücken zu einem Metallamakrozyklus verbunden sind [34]. Außerdem fanden systematische Untersuchungen zur Copolymerisation von Kohlendioxid mit Cyclohexenoxid unter Verwendung von binuclearen Zn-Komplexen als Katalysator statt [35].

Weiterhin wurde zusätzlich die Fähigkeit von Zinkkomplexen zur Kohlendioxid-Übertragung untersucht. E. Dinjus konnte zeigen, dass diese Fähigkeit auch für andere Zusammenhänge, wie z.B. zur Herstellung von Polymeren oder spezieller Carbonsäuren genutzt werden kann. In beiden Fällen wird das reaktionsträge Kohlendioxid tatsächlich gezielt auf eigentlich wenig reaktive Kohlenstoff- oder Sauerstoffatome übertragen. Dort wird es stabil fixiert.

In einer formalen Analogie kann man die Dunkelreaktion der Photosynthese (Energie in Form chemischer Energie gespeichert) mit dem Einsatz von FeS/H₂S als Energielieferant vergleichen. In diesem Sinne gelang es im Jahre 1995 Hafenbradl et al.

[36] Phenylpyruvat in Anwesenheit von frisch gefälltem Eisensulfid in Phenylalanin zu überführen (Gl. 10).



Gl. 10

Dabei wurde NH_4Cl ausschließlich in Kombination mit $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ oder CO_2 zur Aminierung genutzt. Dies sprach für eine katalytische Wirkung von CO_2 . Auch die Umsetzung von p-Hydroxy-phenylpyruvat und Phenylglyoxylat unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde untersucht. Hierbei entstanden die erwarteten Aminosäuren Tyrosin und Phenylglycin nach einigen Tagen in guten Ausbeuten.

3.2 Stickstoff-Reduktion

Distickstoff ist durch eine sehr stabile Dreifachbindung als chemisch inert zu sehen. Bei hohen Temperaturen und Drücken oder unter dem Einfluss von Katalysatoren kann Stickstoff zu zahlreichen Verbindungen reagieren und in Oxidationsstufen von -3 bis +5 vorkommen.

3.2.1 Natürliche Stickstoff-Reduktion

Neben der Photosynthese nimmt die Stickstoff-Fixierung für das heutige Leben auf der Erde eine bedeutende Stellung ein. Für alle Lebewesen ist Stickstoff ein essentieller Baustein für Nucleinsäuren und Proteine. Allerdings können nur wenige Lebewesen ihren Stickstoffbedarf aus dem atmosphärischen Stickstoffreservior (ca. 78 % der

Atmosphäre) decken, trotzdem ist die gebildete Menge „NH₃“ in etwa mit der Menge der Technischen NH₃-Synthese vergleichbar.

Es gibt drei Möglichkeiten der natürlichen Stickstoff-Fixierung:

1. Fixierung durch prokaryotische Organismen (Diazotrophie),
2. Oxidation von elementarem Stickstoff durch atmosphärische Entladungen und
3. Auswaschung von in die Luft entwichenen Stickstoffverbindungen (z.B. Ammoniak) durch Regen.

Einige Bakterien und Cyanobakterien [37], die in großem Ausmaß unter milden Bedingungen (Raumtemperatur und Atmosphärendruck) Stickstoff zu Ammoniak oder Ammonium-Ionen bzw. organischen Stickstoffverbindungen reduzieren. Man unterscheidet dabei frei lebende Bodenbakterien, wie Vertreter der Gattungen *Azotobacter* (aerob lebend), *Closterium* (strikt anaerob), *Klebsiella* (wahlweise aerob) und *Rhodospirillum* (anaerob, mit Photosynthese) und mit grünen Pflanzen (ein bedeutender Vertreter sind die Leguminosen) in Symbiose lebende Bakterien, wie die wirtsspezifischen Knöllchenbakterien (*Rhizobien*) [38, 39].

Knöllchenbakterien findet man unter anderem mit Bohnen und Erbsen, mit Klee, Luzerne und Lupine in Symbiose lebend. Dabei vermögen die Bakterien die Zellwand der Wurzelhaare zu durchdringen und bis ins Cytoplasma der Rindenzellen zu wandern um dort so genannte Knöllchen auszubilden, in denen die Bakterien leben und den Pflanzen Stickstoff leichter verfügbar machen. Im Gegenzug dafür versorgt die Wirtspflanze die Bakterien mit Nährstoffen.

Der biologisch fixierte Stickstoff liegt zunächst in der Biomasse gebunden vor und wird durch den Abbau organischen Materials durch saprophytische Mikroorganismen mineralisiert und in Ammonium überführt (Ammonifikation). Durch Nitrifikation über Nitrit entsteht Nitrat, von dem ein nicht unerheblicher Teil durch Denitrifikation von Bodenmikroorganismen wieder als molekularer Stickstoff an die Atmosphäre verloren geht. Die mineralischen Stickstoffformen Ammonium und Nitrat können von Pflanzen assimiliert werden.

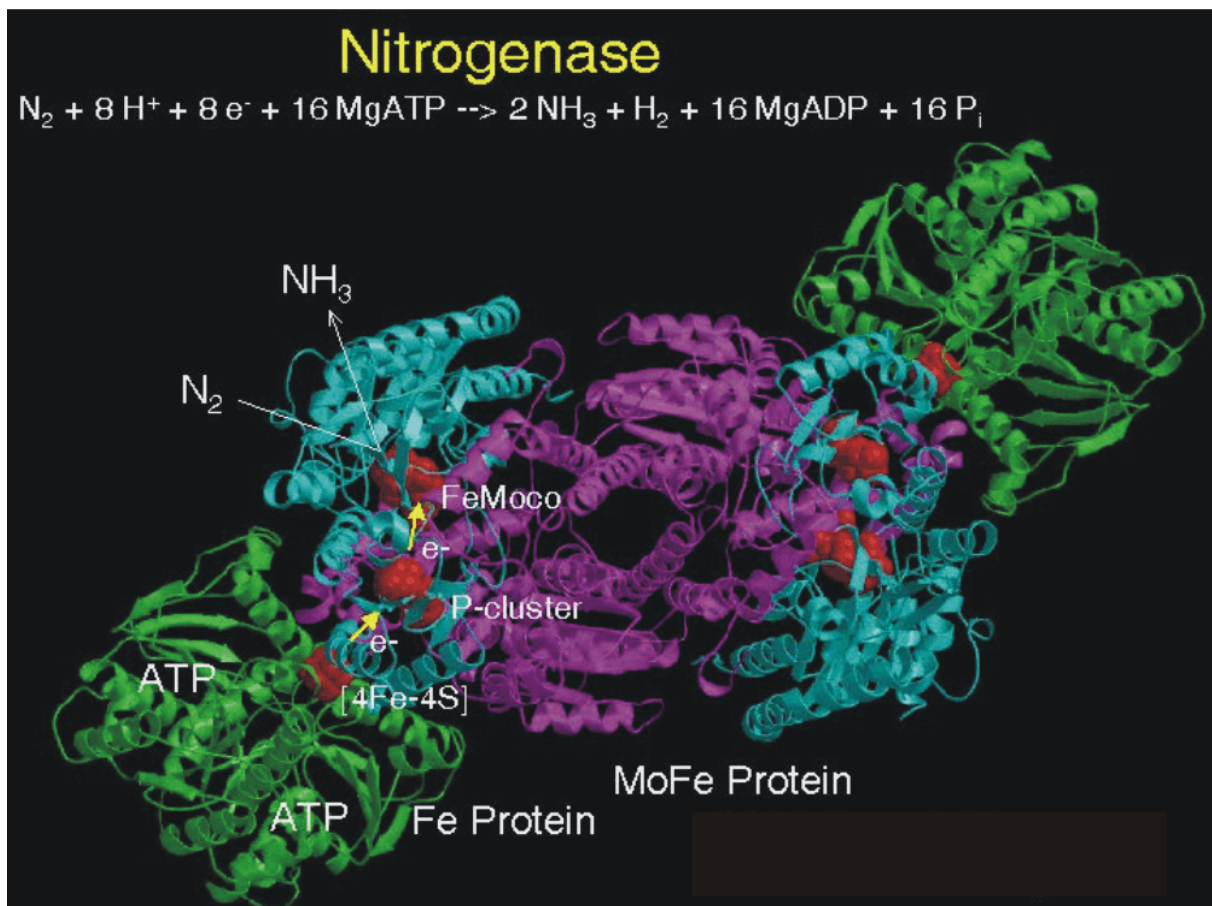


Abb. 10: Nitrogenaseenzym [40,41]

Die Stickstoff-Fixierung erfordert eine extrem hohe Aktivierungsenergie, um die stabile N≡N-Dreifachbindung mit einer Bindungsenergie von 942 kJ/mol zu brechen.

Ein bestimmtes Enzym bzw. Enzymsystem, die Nitrogenase, ist für die biologische Stickstoff-Fixierung unter gleichzeitiger Wasserstoffentwicklung nach der Gleichung in Abb. 10 verantwortlich.

Bei Röntgenstrukturuntersuchungen des Bakteriums *Azotobacter vinelandii* konnten D. C. Rees, M. K. Chan und J. Kim im Jahre 1992 erstmals die genaue Struktur der beiden Nitrogenase-Proteine aufklären [42].

Die Nitrogenase ist aus zwei verschiedenen und voneinander isolierbaren Proteinen aufgebaut, die bei der katalytischen Stickstoff-Fixierung als eine Enzymkomponente zusammenwirken. Diese beiden Metalloproteine werden als Dinitrogenase-Reduktase und Dinitrogenase bezeichnet. Das Enzym Dinitrogenase ist ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer und besitzt zwei katalytische Zentren mit je zwei 4Fe-4S sowie einem FeMo-Cofaktor. Dieser setzt sich aus Fe_4S_3 , Fe_3MoS_3 , Homocitrat und His-Seitenketten zusammen. Das Enzym Dinitrogenase-Reduktase ist ein Dimer von zwei identischen Untereinheiten mit einem gemeinsamen 4Fe-4S-Zentrum und 2 ATP-Bindungsstellen.

Forschungen im Arbeitskreis von A. Müller an der Universität Bielefeld beschäftigten sich mit dem FeMo-Cofaktor, der als reaktives Zentrum gilt. Dieser ist ein relativ symmetrisches molekulares Gebilde mit sieben Eisen-, neun Schwefel- und einem Molybdänatom. Zwei unvollständige Kuben aus vier Metall- und drei Schwefelatomen werden durch drei zentral liegende Schwefelatome zu einem großen Cluster verknüpft, welcher ausreichend Platz für das kleine Stickstoff-Molekül bietet (Abb. 11).

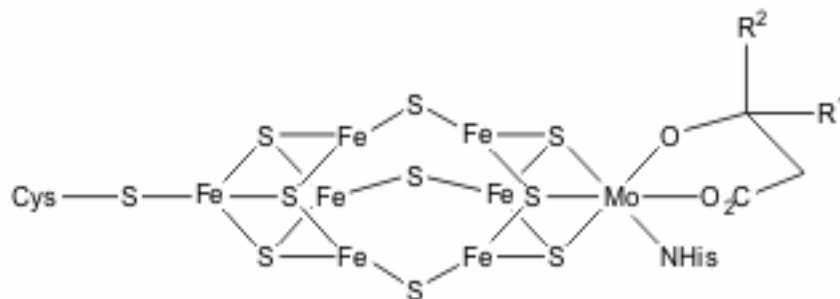


Abb. 11: Strukturmodell des Eisen-Molybdän-Cofaktors der Eisen-Molybdän-Nitrogenase [43]

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, erfolgt die Übertragung der Elektronen vom Fe-Protein zum FeMo-Cofaktor durch das P-Cluster. Abb. 12 beschreibt den Oxidations-Reduktions-Kreislauf des Fe-Proteins in vier Schritten [44].

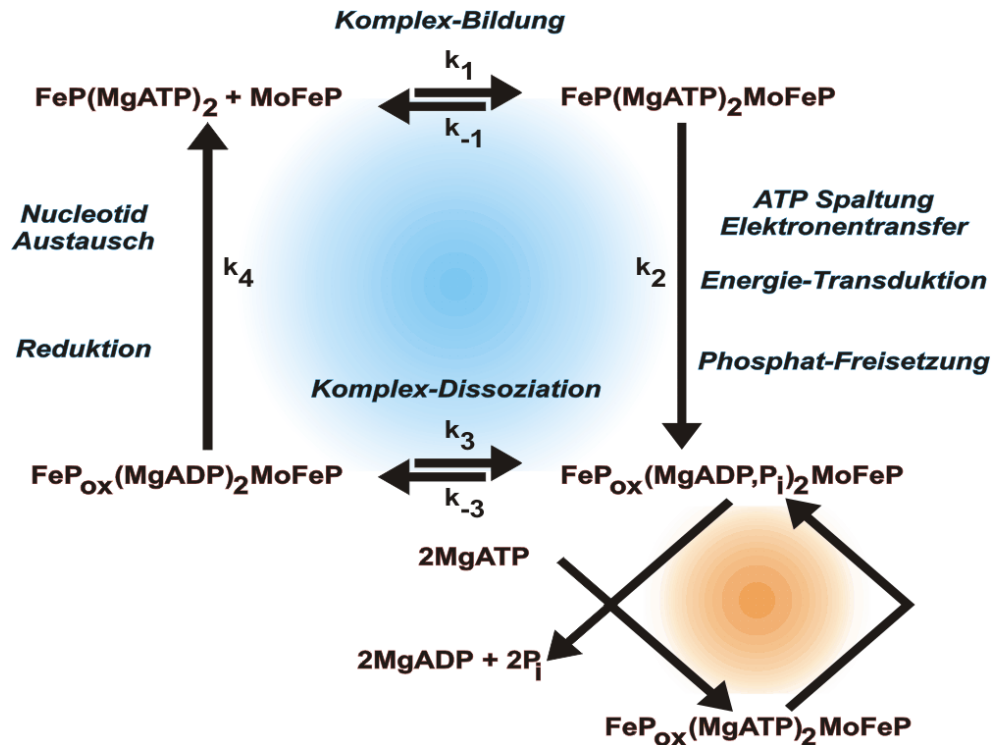


Abb. 12: Fe-Protein Zyklus der Nitrogenase; nach [44]

Im ersten Reaktionsschritt wird das Fe-Protein reduziert. Anschließend kommt es zur Übertragung einzelner Elektronen durch MgATP auf das P-Cluster des FeMo-Proteins. Im dritten Reaktionsschritt folgt die Elektronenübertragung vom P-Cluster zum FeMo-Cofaktor und im letzten Schritt werden die Elektronen auf den Distickstoff übertragen und der Zyklus beginnt von neuem.

Neben der Molybdän-Nitrogenase, welche in allen Stickstoff-fixierenden Bakterien vorkommt, existieren noch Vanadium- oder Eisen-Nitrogenasen. Die Untersuchungen der Bielefelder Wissenschaftler zeigten, dass für die Umsetzung des reaktionsträgen Stickstoff-Moleküls Molybdän nicht unbedingt nötig ist.

Die Eisen-Nitrogenase zeigt eine deutlich geringere Aktivität bei der Stickstoff-Fixierung, erzeugt aber vergleichsweise große Mengen an Wasserstoff [45].

3.2.2 Anthropogene Stickstoff-Reduktion

Im gewissen Kontrast zu den bisher beschriebenen Reaktionswegen steht die Anthropogene Stickstoff-Reduktion. Wegen ihrer Bedeutung sollen die Verfahren der Vollständigkeit halber kurz beschrieben werden.

Leicht lösliche Ammoniumsalze und auch Nitrate dienen den grünen Pflanzen als Stickstoffträger zum Aufbau neuer organischer Materialien und sind so essentiell für das gesamte Leben auf der Erde. Aus diesem Grund werden heute etwa 90 % aller Düngemittel aus Ammoniak hergestellt.

In den Jahren 1905 – 1910 beschäftigte sich der Chemiker F. Haber mit der Möglichkeit der Ammoniak-Herstellung aus den Elementen Wasserstoff und Stickstoff im Labormaßstab. Zwischen 1908 – 1913 gelang es dem Ingenieur C. Bosch die Laborsynthese in den technischen Maßstab zu überführen. Im Jahre 1913 wurde bereits das erste Werk für die synthetische Ammoniak-Gewinnung errichtet. Im Jahre 1998 wurden weltweit etwa 103 Mio. t Ammoniak mit dem Haber-Bosch-Verfahren hergestellt [46].

Anhand von Abb. 13 kann man die Temperatur- und Druckabhängigkeit dieser Reaktion verfolgen.

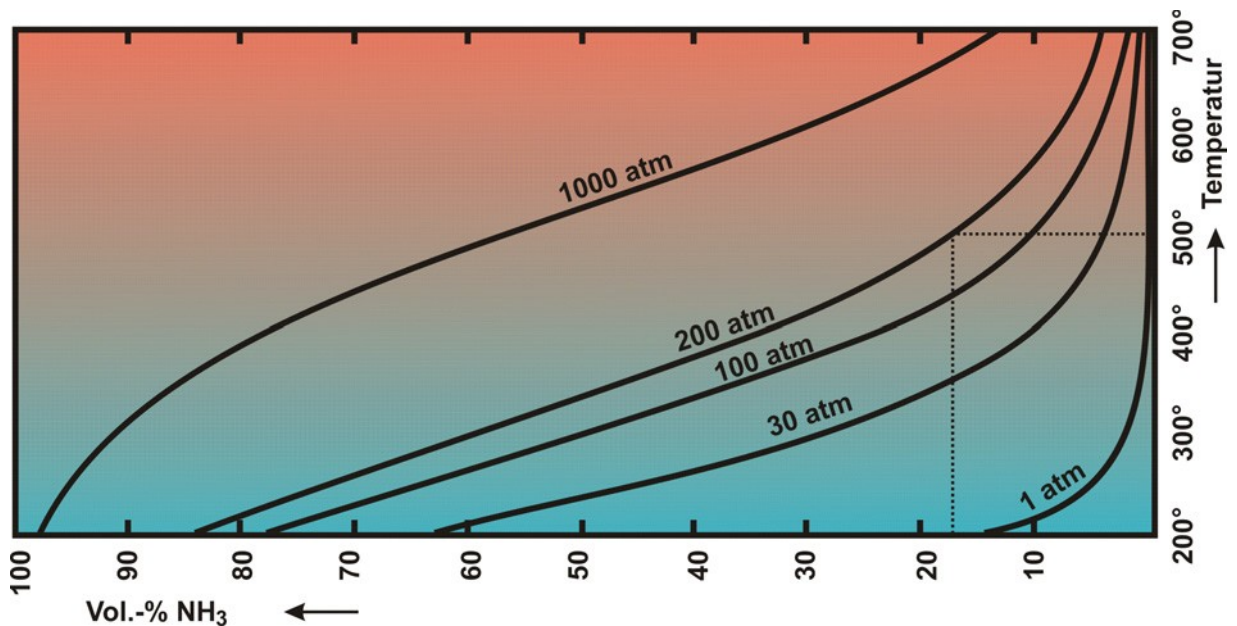


Abb. 13: Diagramm Temperatur/Ausbeute

Bei einem Druck von 200 bar erreicht man eine Ammoniakausbeute von 17,6 Vol.-% [47, 48]. Beide Wissenschaftler wurden für ihre Arbeiten mit dem Nobelpreis für Chemie (F. Haber 1918, C. Bosch 1931) ausgezeichnet.

H. Bielawa et al. berichten in neueren Arbeiten von einem neuen Katalysator für die Ammoniaksynthese nach dem Haber-Bosch-Verfahren. Dieser basiert auf einem Barium-promiierten Rutheniumkomplex, welcher auf oxidischen Trägern gebunden ist [49]. Die Aktivität des neuen Katalysators ist im kinetisch erforderlichen Bereich bis ca. 327°C ungefähr eine Größenordnung höher als die des Eisenkatalysators.

Neben dem Haber-Bosch-Verfahren wurden in den letzten Jahren weitere synthetische Ansätze zur Stickstoffreduktion im Labormaßstab verfolgt. So stellten im Jahre 1965 A. D. Allan und C. V. Senoff den Stickstoff-Komplex $[\text{Ru}(\text{N}_2)(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ -Anion [50] her. Dieser erste Komplex gab den Anstoß zur Synthese einer Vielzahl von Eisen-, Molybdän-, Wolfram-, Vanadium-, Titan-, Zirkonium- oder Tantal-Komplexen. Diese

enthielten den Stickstoffliganden entweder *end-on* ($L_nM-N\equiv N$) oder *verbrückt* ($L_nM-NN-ML_n$) gebunden [51].

Arbeiten von A. E. Shilov et al. zeigten, dass Stickstoff teilweise nahe Normaldruck mit Mo(III)-, Ti(II)-, V(II)-, Nb(III)- und Ta(III)-Hydroxid-Lösungen fixiert werden kann [52].

M. Stoukides et al. beschrieben eine elektrochemische Umsetzung des Stickstoffs unter Normaldruck, jedoch bei hohen Temperaturen (570°C) [53].

Auch D. Sellmann et al. untersuchten die Stickstoff-Reduktion in nichtwässrigem Milieu und synthetisierten einen Diazen-Komplex mit zwei fünfzähligen $[NS_4]$ -Liganden, welcher eine mögliche Zwischenstufe im Stickstoff-Fixierungsprozess sein könnte [54]. Unter anderem gelang es Distickstoff unter milden Bedingungen *end-on* an einen Bisthiolato-Ruthenium(II)-Komplex zu koordinieren. Je zwei Moleküle dieser Komplexe vereinigen sich unter Abspaltung eines N_2 -Liganden zu einer zweikernigen Verbindung, die über eine N_2 -Brücke verknüpft ist. So entwickelten Sellmann et al. ein alternatives Modell zur Ammoniakbildung aus Stickstoff und Wasserstoff in der Koordinationsphäre von Metall-Schwefel-Komplexen.

Eine weitere Möglichkeit zur Ammoniakherstellung wird mit der Veröffentlichung von N. N. Rao et al., welche Stickstoff an Halbleitern wie TiO_2 unter Bestrahlung mit UV-Licht in wässrigem Milieu reduzierten, eingeführt [55]. R. M. Hazen et al. gelang es Luftstickstoff an mineralischen Eisenoxiden zu Ammoniak zu reduzieren [56]. Allerdings sind bei diesen Reduktionsversuchen, die in Goldkapseln durchgeführt werden, ein relativ großer Druck von bis zu 100 MPa und verhältnismäßig hohe Temperaturen von bis zu 800°C erforderlich. Bei diesen Experimenten wird Wasser als Wasserstoffquelle verwendet.

M. Hidai et al. berichten über ein bimetallisches System zur Stickstoff-Fixierung. Dabei handelt es sich um eine Ruthenium-assistierte Protonierung von koordinativ gebundenem Stickstoff mit Wasserstoff an Wolfram [57]. Die Reaktion des Wolfram- Distickstoff-Komplexes $cis-[W(N_2)_2(PMe_2Ph)_4]$ mit einem Gemisch aus $[RuCl(1,3-bis(diphenylphosphino)propan)_2]X$ und $trans-[RuCl(\eta^2-H_2)(1,3-bis(diphenylphosphino)propan)_2]X$, wobei $X = BF_4, PF_6$ oder OSO_2CF_3 sein kann, verläuft bei einem

Druck von 1 atm und 55°C. Innerhalb von 24 Stunden entsteht Ammoniak in mäßiger Ausbeute.

C. C. Cummins et al. beschrieben die Spaltung von Distickstoff durch einen dreifach koordinierten Molybdän(III)-Komplex ($\text{Mo}[\text{N}(\text{R})\text{Ar}]_3$) [58, 59] bei einem Druck von 1 atm und 28°C.

M. A. A. Schoonen und Y. Xu berichteten 2001 über die Stickstoff-Reduktion unter hydrothermalen Bedingungen [60]. Dabei wurde Distickstoff in verdünnter Schwefelwasserstoff-Lösung bei 120°C und einem Druck von 50 bar zu Ammoniak reduziert. Als Katalysator diente hier frisch gefälltes Eisensulfid. Die Analytik wurde mit einem Dionex 2001i Ionenchromatographen durchgeführt.

Kürzlich publizierten D. V. Yandulov und R. R. Schrock eine Methode zur Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak bei Raumtemperatur, einem Druck von 1 atm und einem Molybdän-Katalysator [61]. Es gelang ihnen sechs Zwischenprodukte des Molybdänzentrums der Distickstoff-Reduktion mit Mo(III) bis Mo(VI) zu isolieren und zu untersuchen. Abb. 14 zeigt den Mechanismus der schrittweisen Addition von Elektronen bzw. Protonen.

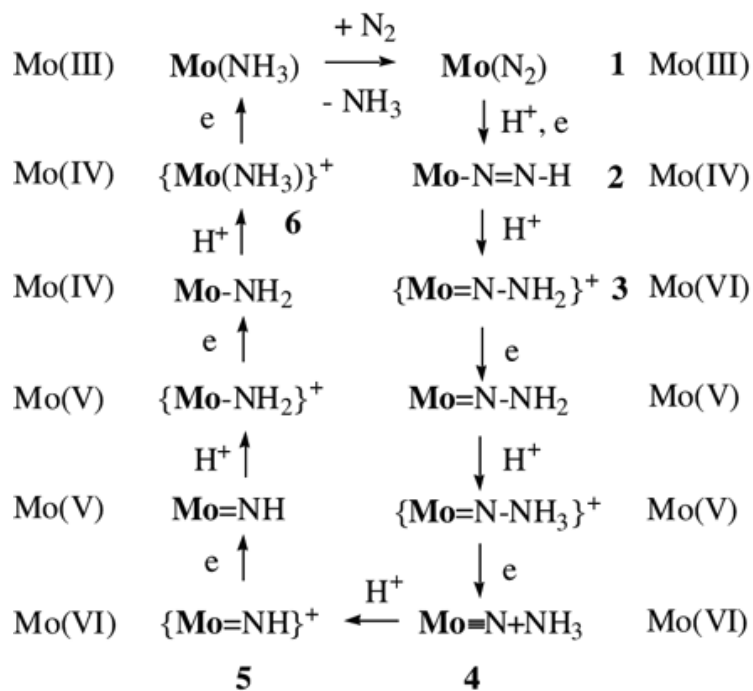
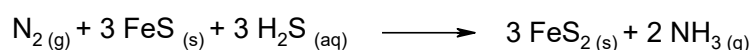


Abb. 14: Mögliche Zwischenprodukte bei der Reduktion von Distickstoff am [HIPTN₃N]Mo-Zentrum (nach [54])

Der entstandene Ammoniak wird als eine Mischung von Ammoniumchlorid und Lutedinhydrochlorid (2,6-LutHCl) erhalten und per Indophenolmethode analysiert. Yandulov und Schrock erreichen mit dieser Methode Ausbeuten von über 60% Ammoniak (7 – 8 Äquivalente Ammoniak).

4. Stickstoff-Reduktion an einer Eisensulfid-Oberfläche

Die in den vorangegangenen Kapiteln gemachten Betrachtungen zeigten, dass Distickstoff als inertes Gas nur schwer zu fixieren und damit zu aktivieren ist. Untersuchungen zahlreicher Wissenschaftler führten zu einer Reihe von Wegen unter Verwendung von geeigneten Katalysatoren, welche in ihrem aktiven Zentrum Übergangsmetalle wie Eisen, Nickel, Cobalt und Ruthenium enthalten, Distickstoff chemisch zugänglich zu machen. Außerdem wurde gezeigt, dass vor allem das biologisch wirksame Molybdän, z. B. in Form von Enzymen (Nitrogenase) Distickstoff fixiert und in Ammoniak bzw. Ammonium-Verbindungen umwandelt. In Anlehnung an die Untersuchungen von Wächtershäuser sollte es möglich sein, elementaren Stickstoff an den von ihm erwähnten Metallsulfiden in Anwesenheit von Schwefelwasserstoff aber unter Ausschluss von Luftsauerstoff zu fixieren. Wie in Gl. 1 beschrieben, die Umsetzung von Eisensulfid zu Eisendisulfid exergonisch verläuft, sollte die Reaktion von elementarem Stickstoff in Anwesenheit von Eisensulfid und Schwefelwasserstoff zu Eisendisulfid und Ammoniak (Gl. 10) ebenfalls exergonisch verlaufen.



$$\Delta G^\circ < 0$$

Gl. 1

Wenn man die Fixierung von Stickstoff nach dem Vorbild der Nitrogenase und das katalytische Vermögen der an den Schwarzen Rauchern gefundenen Metallsulfide kombiniert, kommt man zu der Hypothese, dass sich möglicherweise an der Oberfläche von amorph gefällten Eisensulfiden die Fe^{2+} - und S^{2-} -Atome in einigen Fällen so anordnen, dass dem aktivem Zentrum der Nitrogenase vergleichbare Motive entstehen und diese dann analoge Reaktionskanäle öffnen.

Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten wurde zum einen gemäß dem thermodynamischen Antrieb der Eisensulfid/ Eisendisulfid-Umsetzung die Reduktion von elementarem Stickstoff unter milden Bedingungen (80°C und Normaldruck) an der Oberfläche von amorph gefälltem Eisensulfid zu Ammoniak untersucht und optimiert. Dazu wurde die entwickelte Versuchsanordnung mit Hilfe einer Computersteuerung automatisiert, der Einfluss von Druck und UV-Licht auf das Reaktionsergebnis und die Aktivität von Übergangsmetall-Mischsulfiden anhand von Modellreaktionen untersucht.

4.1 Eisensulfide

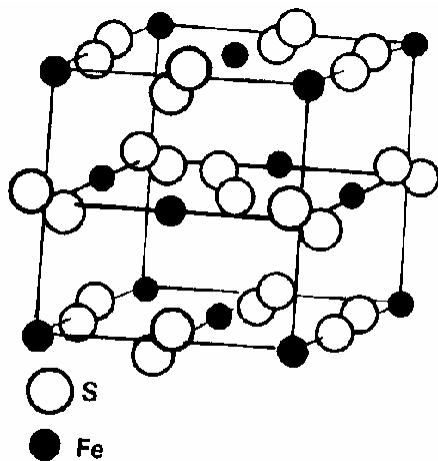


Abb. 15: Anordnung im Pyritgitter

Eisensulfide kommen in der Natur vorwiegend als
a) Eisen(II)-sulfid FeS (Pyrrhotin – kristallisiert oberhalb 300°C dihexagonal- dipyrimidal oder Troilit – hexagonal),
b) Eisendisulfid FeS_2 (Pyrit – kubisch oder Markasit – rhombisch) vor.

Von Pyrit und dem öfters mit ihm verwachsenen Markasit gibt es mehr als 200 verschiedene Kristallformen, wobei die häufigsten Würfel und Pentagondodekaeder sind (Abb. 15).

Nach W. Martin weist die Eisensulfid-Oberfläche wabenartige Strukturen auf. Die Abb. 16 a) bis d) und Abb. 17 zeigen deutlich die unter 2.4 beschriebenen Poren des Pyrits, in denen sich organische Moleküle einlagern könnten.

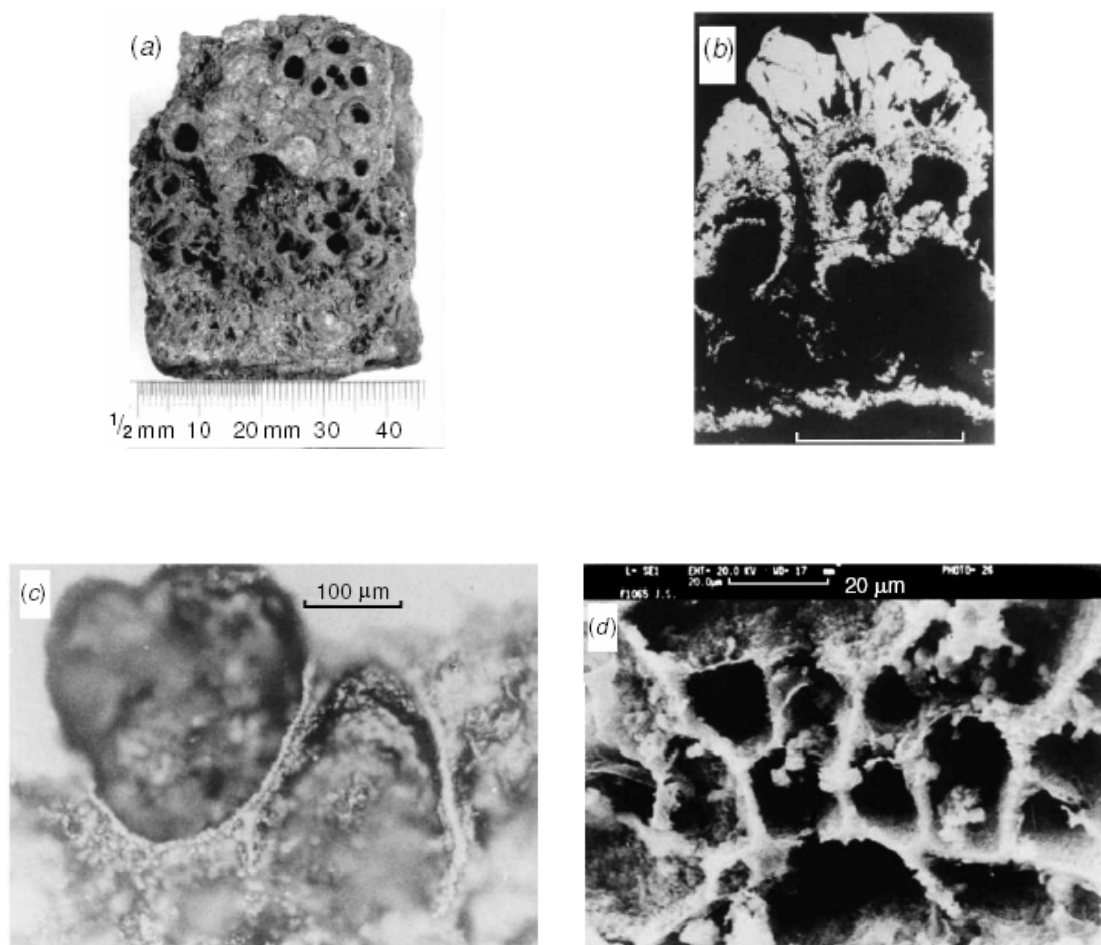


Abb. 16: Aufnahmen von Eisensulfid - (a) 360 Mio. Jahre altes Eisensulfid hydrothermalen Herkunft, (b) und (c) elektronenmikroskopische Aufnahmen von 360 Mio. Jahre altem Eisensulfid aus Irland, (d) elektronenmikroskopische Aufnahme von Eisensulfid, hergestellt aus Na_2S und FeCl_2

W. Martin und sein Kollege M. Russell vom *Scottish Environmental Research Centre* behaupten, dass die ersten Zellen keine lebenden waren, sondern „anorganische Zellen“ aus Eisensulfid [62]. Diese bildeten sich nicht auf der Erdoberfläche, sondern in totaler Finsternis am Meeresboden. Im Inneren der Zellen sammelten sich Sulfide, Cyanide, Kohlenmonoxid und Wasserstoff. Diese sollen schließlich miteinander reagiert und die ersten lebenden Organismen gebildet haben.

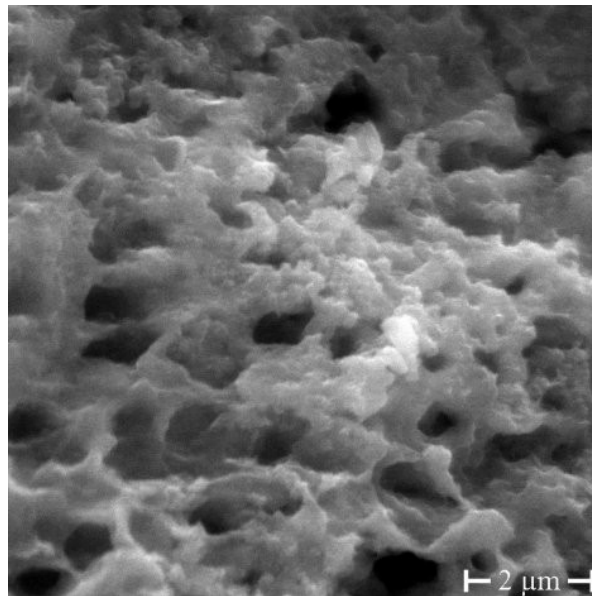


Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Eisensulfid-Nanopartikeln

Die positiv geladene Pyritoberfläche erlaubt eine Anlagerung anorganischer Anionen wie HS^- , HCO_3^- und HPO_3^- und organischer Moleküle mit anionischen Gruppen, wie Carboxylat oder Phosphat.

Ausschlaggebend für die Verweilzeit der organischen Moleküle auf der Pyritoberfläche ist die Stärke der Bindung. Dabei unterscheidet man Physisorption bei schwachen Bindungen mit einer Energie von ca. 20 kJ/mol und Chemisorption mit einer etwa zehnmal so großen Bindungsenergie. Nach den Regeln von K. Fajans [63] korreliert die Bindungsstärke eines Ions an die Oberfläche eines Minerals mit der Wasserunlöslichkeit des entsprechenden Salzes. Im Falle des Pyrits sollte man die Wasserlöslichkeit von Ammoniumsalzen des Disulfid-Anions (S_2^{2-}) betrachten. Da Ammoniumdisulfid und alle verwandten Verbindungen mit stickstoffhaltigen Kationen eine jeweils sehr gute Wasserlöslichkeit zeigen, kann in diesen Fällen nur von einer schwachen Physisorption ausgegangen werden.

Betrachtet man die Anionen, so kann man sagen, dass hydrophile Monocarbonsäuren keine wasserunlöslichen Salze mit dem Eisen(II)-Ion bilden. Lange, hydrophobe Fettsäuren bilden hingegen unlösliche Salze mit diesem Ion. Auch alle Polycarboxylate

verhalten sich ebenso. Die Thiolat-Gruppe bildet sogar besonders stabile Bindungen mit kovalentem Anteil aus. Wichtig sind auch noch die Monophosphatester-Gruppen, die in allen phosphorylierten Verbindungen vorkommen und starke Bindungen zur Pyritoberfläche ausbilden sollten.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die biologisch wichtigen Anionen nur bei dem physiologisch neutralem pH-Wert vorliegen. In saurem Milieu sind z.B. Carboxylat-Gruppen protoniert und binden nicht mehr an die Pyritoberfläche.

4.2 Versuchsaapparatur

Da nur geringe Ausbeuten an Ammoniak bei der hier beschriebenen Aktivierung bzw. Fixierung von Distickstoff zu erwarten waren, wurde nach einer Reihe von Vorversuchen eine Apparatur im „Pilot-Plant-Maßstab“ konstruiert. Wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche und reproduzierbare Durchführung des Experiments ist der quantitative Ausschluss von Ammoniumkontaminationen. Es ergab sich das in Anhang A dargestellte „worst-case“-Szenario.

Die denkbaren Ammonium-Verunreinigungen der festen Ausgangsstoffe, wie $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ wurden anhand der Lieferzertifikate berechnet und durch Analysen der Fa. Analytik Jena AG (Analytik Jena AG, 07745 Jena, Mess- und Regeltechnik) überprüft. Wenn man annimmt, dass der ermittelte absolute Stickstoffgehalt vollständig aus Ammoniak resultiert, kann man die maximale Ammonium-Verunreinigung abschätzen.

Für einen typischen Ansatz von 3 Mol Eisensulfid bedeutet dies einen Ammoniakgehalt von 3,46 mg der Edukten (FeSO_4 , Na_2S , H_2SO_4 , NaOH und H_2O). Außerdem ist weiterhin die maximal mögliche Ammonium-Verunreinigung von dem Inertgas Argon

und dem Reaktandgas Stickstoff. Im Durchschnitt wurde die Eisensulfid-Suspension vor Reaktionsbeginn für etwa 2 Wochen mit Argon durchströmt, um die oben beschriebene Ammonium-Kontamination der Edukte auszutreiben. Bei einem Fluss von 10 L/h wurden in diesem Zeitraum etwa 3000 L Argon und anschließend für 2 Wochen Stickstoff mit 2 – 3 L/h durch die Suspension geleitet. Für die Gase wurde mittels der Lieferzertifikate eine maximale Ammonium-Kontamination von 9,87 mg bestimmte. Da sich nach Reaktionsende wiederum eine zweiwöchige Phase zum Austrieb des entstandenen Ammoniaks anschließt, geht dessen Anteil an der Gesamt-Ammonium- Kontamination doppelt ein. Die Berechnung für einen 3 Mol Eisensulfid-Versuch mit angenommenen 6 Wochen Reaktionszeit ergibt eine mögliche Ammonium- Kontamination von 15,61 mg.

Um Ammonium-Kontaminationen aus der Umgebungsluft zu vermeiden, wurden ausschließlich Edelstahl- oder Glasverbindungsleitungen und Teflondichtungen verwendet. Zusätzlich wurde für die gesamte Versuchsdauer ein geringer Überdruck von Inert- bzw. Reaktionsgas angelegt. Die oben getroffene Abschätzung zeigte vor allem eine mögliche Kontamination durch die eingesetzten Gase. Da diese Verunreinigungen unsere Ergebnisse beträchtlich verfälschen würden, erfolgte eine systematische Reinigung der verwendeten Gase. Die Abwesenheit von Ammoniak wurde dabei mittels Merck-Test Aquaquant® gesichert. Die Gase wurden einer 4-stufigen Reinigungsprozedur unterzogen. Dabei durchläuft das jeweilige Gas zunächst einen kommerziellen Stickstoffgasreiniger (> 10 ppb für H_2O , H_2 , O_2 , NO , NH_3 , CO , CO_2 und CH_4), anschließend wird es durch eine $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung geleitet, um oxidierbare Bestandteile zu eliminieren. Daran schließt sich eine Wäsche mit 10M KOH-Lösung, um saure Bestandteile und daran wiederum eine Wäsche mit 1/10N H_2SO_4 -Lösung, um basische Bestandteile zu entfernen, an. Zur zusätzlichen Kontrolle wurden Blindversuche ohne Eisensulfid-Suspension durchgeführt.

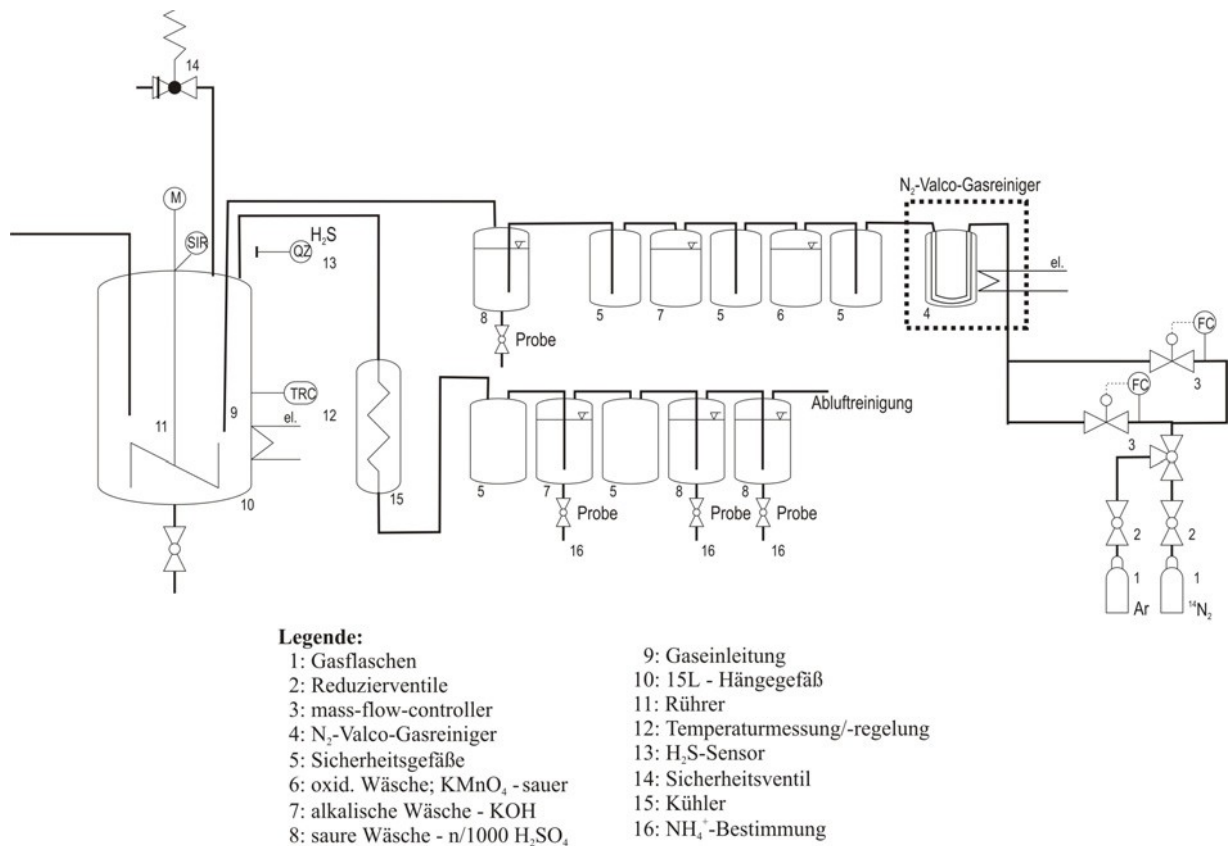


Abb. 18: Schema der Pilot-Plant-Anlage

Abb. 18 zeigt das Schema der Versuchapparatur zur Fixierung von Distickstoff in Form von Ammoniak genauer. Dabei lässt sich erkennen, dass nach jedem Wasch- bzw. Auffanggefäß ein Sicherheitsgefäß installiert wurde. Die Sicherheitsgefäße werden bei Druckänderungen in der Apparatur während des Reaktionsverlaufes durch beispielsweise Stromausfall und die damit verbundene Abkühlung der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wichtig, da in diesem Falle möglicherweise zum einen die Waschlösungen oder Adsorptionslösungen vermischt und somit unbrauchbar werden und zum anderen durch eben diese die Reaktionslösung kontaminiert werden könnte.

Die Regelung der Gasströme wird über Flow-Controller vorgenommen. Mit ihnen lassen sich Gasströme zwischen 0,5 L/h bis 400 L/h einstellen.

Zum Rühren der Suspension wird aufgrund der besonderen Konstruktion des Reaktors (Auslauf an der Unterseite) ein Teflon-Platten-Rührer, welcher mit der gesamten Apparatur mit Argon gespült wurde, verwendet.

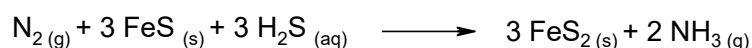
Die Thermostatierung der Reaktionslösung erfolgt durch einen an den Reaktor angepassten regelbaren Heizpilz der Fa. Horst. Dabei wird die Temperatur mittels Thermofühler fortlaufend online gemessen und über ein entsprechendes Steuergerät eingestellt.

Bei jedem durchgeführten Experiment wurde das frisch gefällte Eisensulfid bei einem pH-Wert von 12 bis 13 mit Argon solange durchströmt, bis in der anschließenden Adsorptionslösung keine Ammonium-Ionen mehr nachweisbar waren.

4.3 Durchführung der Stickstoff-Fixierungs-Reaktion

Die geringe Ammoniakausbeute bei der Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak gestaltete die Analytik außerordentlich schwierig. Aus diesem Grund wurde für die Reaktionsführung eine Ansatzgröße von 3 Mol Eisensulfid bestimmt.

Für die Durchführung wurden mit Atmosphärendruck, einer Temperatur von 80°C und unter Luft- bzw. Sauerstoffausschluss Reaktionsbedingungen gewählt, die durchaus auch in der Umgebung der Metallsulfide an den Rändern der schwarzen Raucher zu finden sind.



$$\Delta G^\circ < 0$$

Gl. 1

Nachdem sämtliche Ammonium-Verunreinigungen, wie unter 4.2 beschrieben, aus der Eisensulfid-Suspension entfernt waren, wurde der pH-Wert auf 3 eingestellt und das Reaktionsgas Stickstoff mit 7 L/h für 14 Tage bei 80°C unter ständigem Rühren durch die Reaktionslösung geleitet. Anschließend wurde wieder auf einen pH-Wert von 12 bis 13 umgestellt und das entstandene Ammoniak unter Rühren mittels Argonstrom aus der Suspension ausgetrieben, in dem nachgeschalteten Gefäß, welches mit n/1000 H₂SO₄ gefüllt war, aufgefangen und mit dem Farbttest Merck Aquaquant® nachgewiesen. Die Triebkraft dieser Reaktion resultiert, wie Gl. 1 zeigt, aus der Bildung von Pyrit.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu untermauern, wurden auch Experimente mit isotonenmarkierten Stickstoff durchgeführt. Die Analytik dieser Experimente wurde mit Hilfe von W. Brand et al. vom MPI für Biogeochemie Jena mittels der *Isotope Ratio Mass Spectroscopy* durchgeführt. Die Entstehung von ¹⁵N-Ammoniak oberhalb des natürlichen Untergrundes konnte auch hier eindeutig nachgewiesen werden.

4.4 Bei der Reaktionsführung aufgetretene Probleme und ihre Lösungen

Die Länge der Versuchszeit hängt direkt vom Zeitaufwand für die notwendige Ammonium-Dekontamination der frisch hergestellten Eisensulfid-Suspension (zwischen 4 - 8 Wochen) ab. Des Weiteren folgen 2 Wochen Reaktionszeit und anschließend wieder einen längere Phase (6 - 8 Wochen) um das entstandene Ammoniak aus der Suspension zu gewinnen. Diese langen Versuchszeiten erschweren die Variation der Versuchsbedingungen entscheidend. Aus diesem Grund lag es nahe, nach Modellsystemen zu suchen, die schon nach verhältnismäßig kurzer Reaktionszeit (5 - 17 Stunden) Aussagen über die jeweilige Aktivität des Eisensulfides und die Auswirkungen veränderter Reaktionsparameter zulassen.

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, gelang 1995 Hafenbradl et al. die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren mittels FeS/H₂S-System; damals noch unter Verwendung von CO₂ bzw. (NH₄)₂CO₃ als katalytische Einheit. Diese Arbeiten wurden von C. Huber wieder aufgenommen und durch geringe Veränderungen der Reaktionsbedingungen die Ausbeute deutlich erhöht.

Da bei der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat schon nach 17 h Reaktionszeit und kleinen Ansätzen (4 mmol) eine 55%-ige Ausbeute an Phenylalanin zu erhalten war, fiel die Wahl auf diese Reaktion. Auch die Analytik gestaltet sich deutlich einfacher, da hier im Gegensatz zum Hauptversuch die Proben direkt aus der Reaktionsmischung entnommen und nach einfacher Vorbereitung gemessen werden können.

Ein zweites Problem gründet sich auf der Beobachtung, dass sich der pH-Wert der Reaktionslösung während des Versuches unabhängig von gewollter Veränderung alterniert. Um diesem entgegen zu wirken, schien der Einbau einer online-pH-Überwachung notwendig, um eventuelle Schwankungen abzufangen bzw. umgehend zu korrigieren.

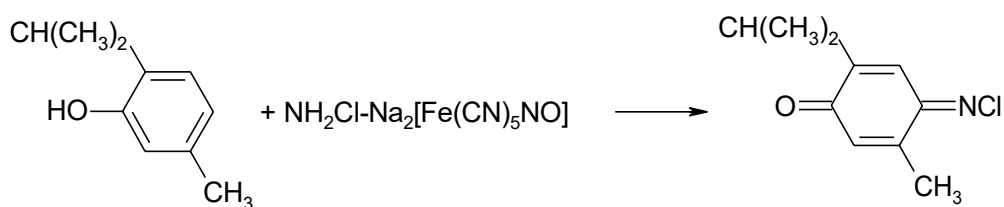
Große Bedeutung für die Aktivität des frisch gefällten Eisensulfides hat die Partikelgröße des amorphen Eisensulfides. Diese wird zum einen durch die Rührgeschwindigkeit und zum anderen maßgeblich durch die Mischgeschwindigkeit bzw. den Konzentrationen der beiden Edukt-Lösungen bestimmt. So beobachteten wir eine schlagartige Verklumpung des Eisensulfids bei geringer Drehzahl des Rührers bzw. bei zu schnellem Vermischen der beiden wässrigen Edukt-Lösungen. Bei den Folgeexperimenten wurde die Drehzahl des Rührers hinreichend groß gewählt. Die Fällung der Eisensulfid-Suspension sollte möglichst reproduzierbar durchgeführt werden. Dafür wurde ein computergesteuertes Programm entwickelt, welches präzise Fällung mit definierter Partikelgröße des Eisensulfides, wie unter 5.1 beschrieben, zulässt.

4.5 Analytik des Hauptversuches

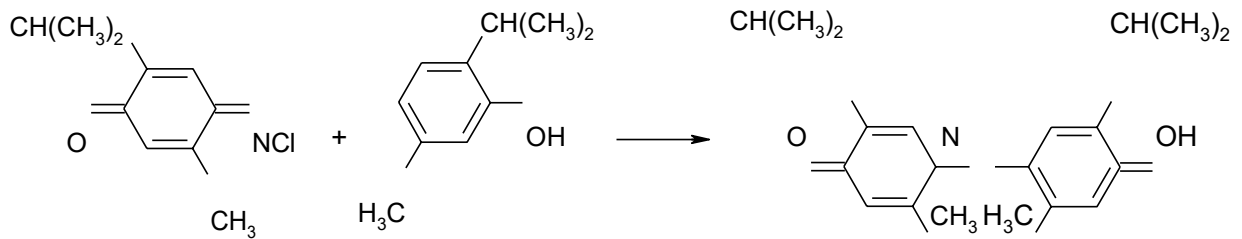
Durch den hohen Schwefel- bzw. Sulfidgehalt und eine aufwendige Probenvorbereitung aus der Sulfidsuspension konnte die Analytik nicht direkt im Reaktionsgemisch durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde der produzierte Ammoniak aus dem Reaktionsgemisch mittels Argonstrom ausgetrieben. Um Sulfidspuren aus dem Gasstrom auszuwaschen, wurde er durch eine zehnmolare Natriumhydroxidlösung geleitet und der enthaltene Ammoniak anschließend in einer n/1000 Schwefelsäure aufgefangen. Aus dieser Lösung kann dieser dann als Ammonium mit zwei im Folgenden vorgestellte kommerziell erhältliche Test analysiert werden.

4.5.1 Aquaquant® der Fa. Merck (Berthelot's Reaktion)

Der Test basiert auf der Indophenolblaureaktion. Aus trockenem Chlorierungsmittel wird im alkalischen Medium Hypochlorit erzeugt. Dieses reagiert bei einem pH-Wert von 13 mit Ammoniak zu Monochloramin. Unter dem Einfluss von Dinatriumpentacyanonitrosylferrat entsteht aus Monochloramin und Thymol N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinonmonoimin (Gl. 11), das sich mit einem weiteren Thymol-molekül zum entsprechenden Indophenolblau umsetzt (Gl. 12).



Gl. 11



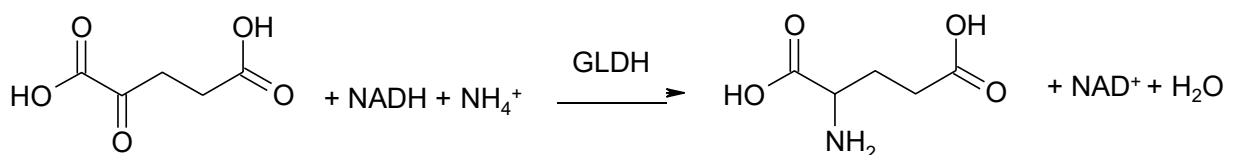
Gl. 12

Es sind zwei verschiedene Tests im Einsatz: Der Merck-Aquaquant® Test ist ein optischer Schnelltest mit einer Farbvergleichstabelle. Er erlaubt eine schnelle Abschätzung der Ammoniumkonzentration. Sein Messbereich liegt zwischen 0,5 mg NH₄⁺/L bis 10 mg NH₄⁺/L.

Eine genauere Quantifizierung der Ammonium-Konzentration ist mit dem spektroskopischen Test Merck-Spektoquant® möglich. Der Hersteller gibt das Nachweisintervall mit 0,03 mg NH₄⁺/L bis 10 mg NH₄⁺/L an.

4.5.2 Ammoniak-Enzymtest der Fa. Boehringer Mannheim

Das zu bestimmende Ammoniak setzt 2-Oxoglutarat in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Glutamat um, wobei NADH verbraucht wird (Gl. 13).



Gl. 13

Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniak-Menge äquivalent. Dabei ist NADH die Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm quantitativ bestimmbar.

5. Direkte Optimierung der Distickstoff-Reduktionsreaktion

5.1 Automatisierung der Versuchsanlage

Um die Experimente an der Pilot-Plant-Anlage (Abb. 19) reproduzierbarer zu gestalten, wurde mittels einer optischen Programmiersprache (HP-Vee) eine weitestgehende Automatisierung der Reaktionsabläufe entwickelt.

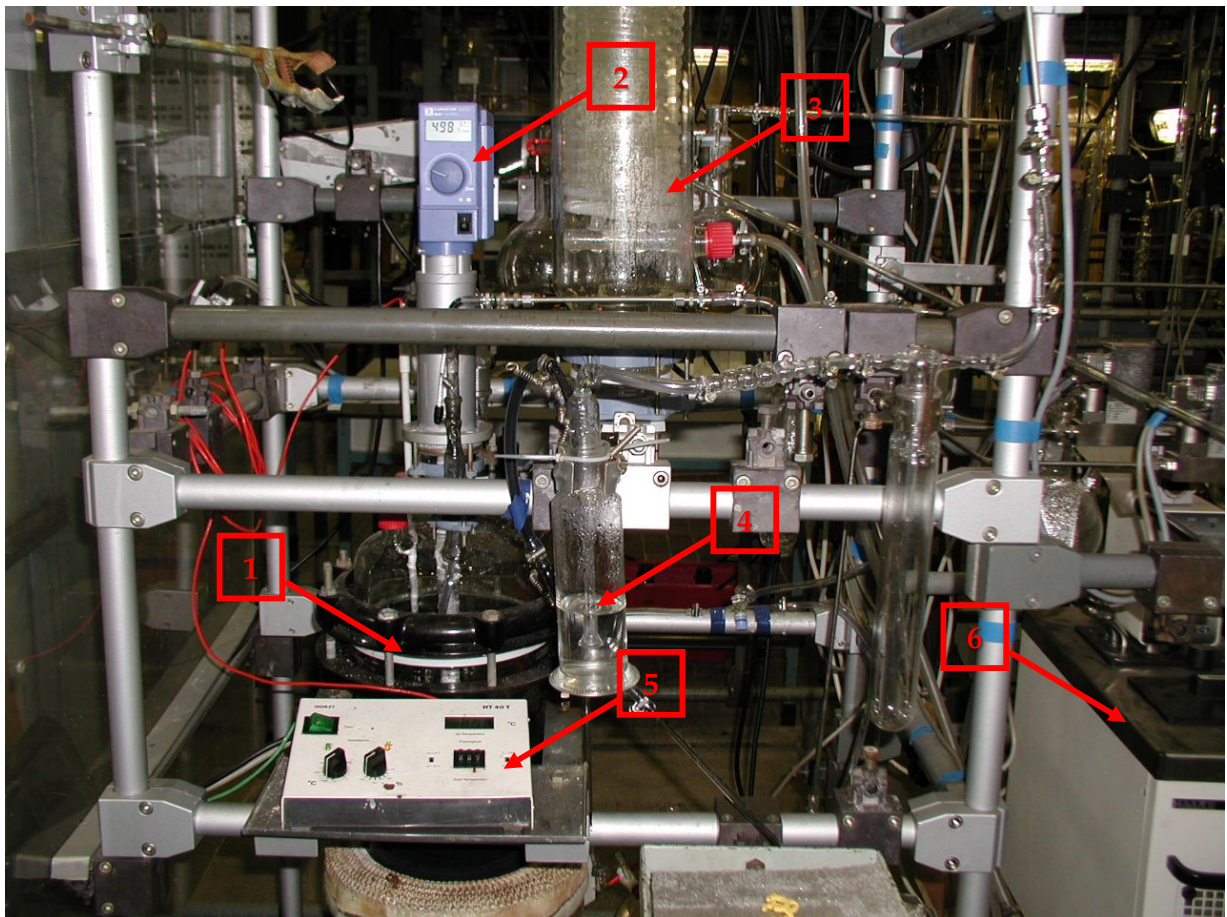


Abb. 19: Aufnahme der Pilot-Plant-Anlage zur Stickstoffreduktion ([1] Reaktionsgefäß, [2] Rührer, [3] Kühler, [4] saure Gaswäsche ($n/1000 \text{ H}_2\text{SO}_4$), [5] Temperatursteuerung, [6] Kryostat)

5. Direkte Optimierung der Distickstoff-Reduktion

Für den Anwender stehen anhand einer übersichtlichen Benutzeroberfläche vier voneinander unabhängig anwendbare Einzelprogramme (Module) zur Verfügung (Abb. 20).

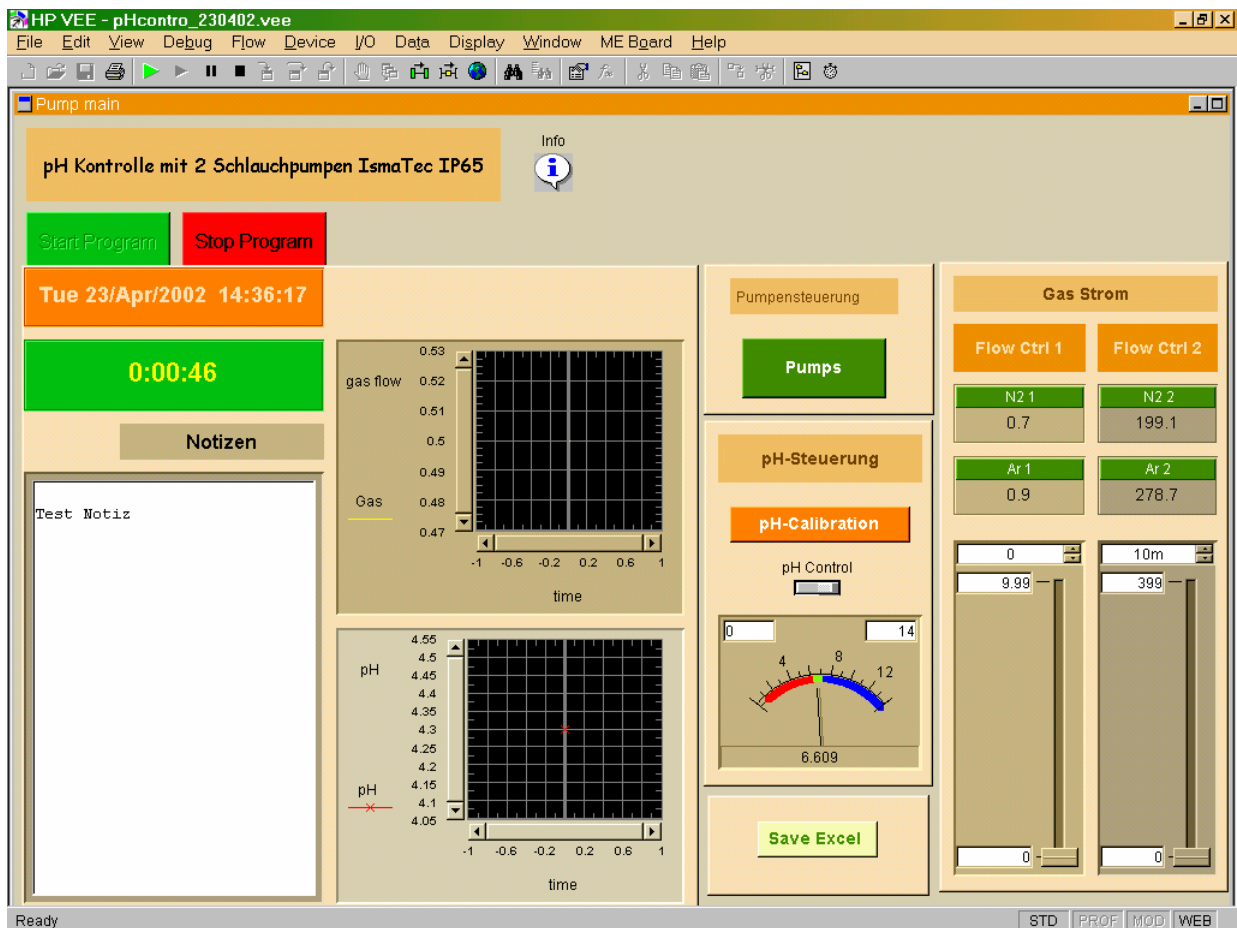


Abb. 20: Hauptsteuerfenster des Programms

Von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Experimente ist der umgebungstemperaturunabhängige und gleichmäßige Gasfluss der verwendeten Gase. Das Modul „Gasflow“ ermöglicht eine genaue Steuerung zweier Flow-Controller, wodurch die Ströme im Bereich von 0,5 L/h bis 400 L/h des Inertgases Argon bzw. des Reaktandgases Stickstoff mit hoher Genauigkeit eingestellt werden können.

Während der mehrwöchigen Reaktion ist es notwendig, den pH-Wert der Eisensulfid-Suspension zum einen über längere Zeit stabil zu halten und zum anderen mehrmals

5. Direkte Optimierung der Distickstoff-Reduktion

zwischen pH 3 - 4 und 10 - 11 zu wechseln, da vor Beginn der eigentlichen Fixierung des Distickstoffs die in den Edukten enthaltenen Ammonium-Verunreinigungen basisch aus der frisch gefällten Eisensulfid-Suspension ausgetrieben werden müssen. Die Fixierungsreaktion verläuft anschließend in einem sauren Milieu. Aus diesem Grund wurde das Modul „Pumps“ entwickelt mit dem zwei Schlauchpumpen (zum Dosieren von Säuren und Laugen bzw. Edukt-Lösungen) unabhängig voneinander über eine serielle RS232-Schnittstelle angesteuert werden können.

Neben der pH-Wert-Steuerung bietet das Pumpensteuermodule die Möglichkeit das benötigte Eisensulfid definiert zu fällen.

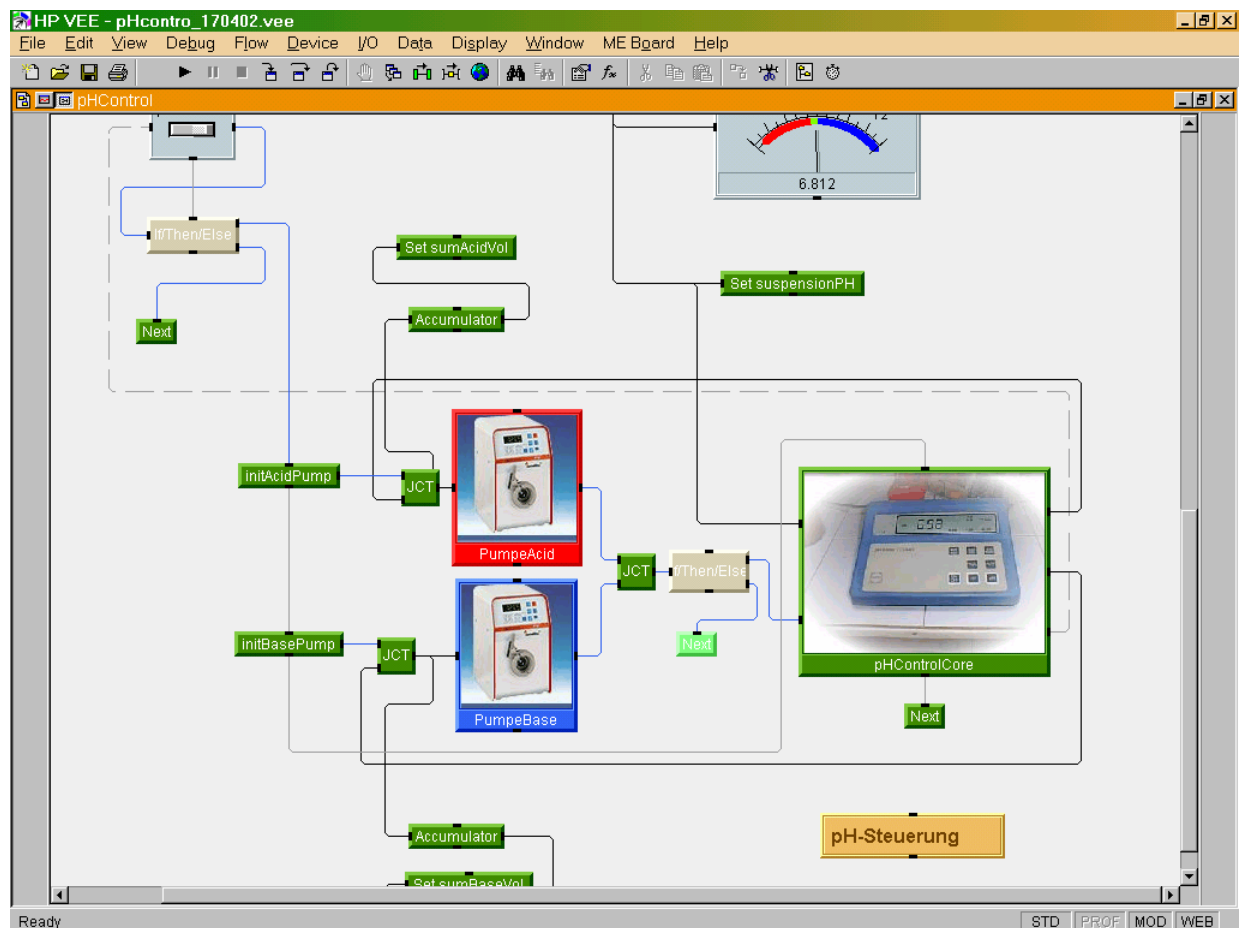


Abb. 21: Ausschnitt aus dem Programmcode der graphischen Programmiersprache HP-Vee

In Verbindung mit einem dritten Modul, welches den pH-Wert der Suspension mit Hilfe einer elektrolytfreien, sulfidunempfindlichen pH-Elektrode der Fa. Mettler-Toledo (pH-Bereich von 0 bis 14 und einem Temperatur-Bereich von 0 bis 100°C) in voreingestellten Intervallen bestimmt und gegebenenfalls über einen integrierten PID-Regler korrigiert, wird der pH-Wert wie gewünscht eingestellt. Dabei wird über ein pH-Meter die Spannungsänderung als analoges Signal erfasst und in ein digitales Signal, welches an den PID-Regler weitergeleitet wird, umgewandelt. Aus den erhaltenen Daten wird ein entsprechendes Volumen von Säure oder Base errechnet und zudosiert. Dadurch erreicht man eine Online-Überwachung des pH-Wertes, die selbstständig auf Änderungen im Reaktionsverlauf reagiert [70].

Die langen Reaktionszeiten, welche von dem Grad der anfänglichen Kontamination der Ammonium-Verunreinigungen abhängen, erschweren die Reproduzierbarkeit der Reaktionsbedingungen. Aus diesem Grund wurde ein viertes Modul entwickelt, welches eine genaue Dokumentation von Prozessdaten, wie Temperatur, pH-Wert, Gasflüsse und Reaktionsdauer ermöglicht. Der Anwender kann diese Daten während des laufenden Experiments jederzeit graphisch in Form von Diagrammen und in tabellarischer Form als Excel-Datei abfragen. Aus diesen Daten lassen sich für Folgeversuche zum einen der Zeitaufwand und zum anderen der Chemikalienaufwand (Säure und Base) wie auch das benötigte Volumen der Gase besser abschätzen.

5.2 Aktivierung des Distickstoffs mit UV-Licht

Wie schon unter 3.2.2 beschrieben, gelang es N. N. Rao et al. die Energie des UV-Licht zur Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak zu nutzen. Als Katalysoberfläche wurde der Halbleiter TiO₂ verwendet.

In Kapitel 4.2 wurde bereits berichtet, dass es nach anfänglichen Schwierigkeiten möglich war, Distickstoff an der Oberfläche von frisch gefälltem Eisensulfid zu Ammoniak zu überführen.

Wenn man die Erfahrungen beider Verfahren kombiniert, sollte also die Reduktion von Distickstoff mit thermischer und photochemischer Energie zu höheren Umsätzen und Ausbeuten führen. Dazu wurde ein geeigneter Reaktor entwickelt (Abb. 22, Abb. 23).

Die mit UV-Licht-Bestrahlung durchgeführten Versuche ergaben höhere Ammoniak-ausbeuten als bei den Versuchen in der Pilotanlage nachgewiesen werden konnte.

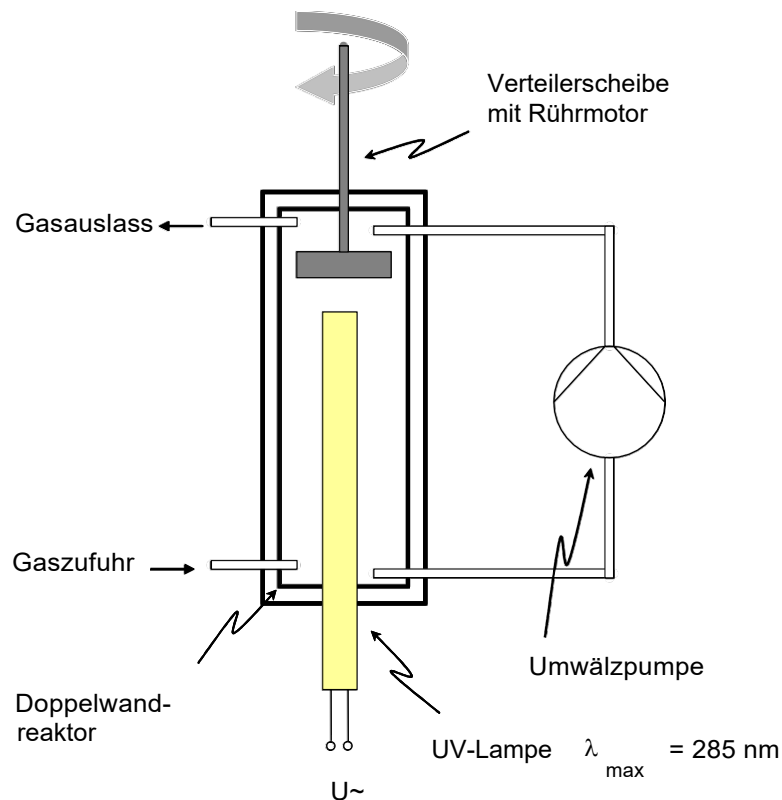


Abb. 22: Dünnschichtapparatur zur UV-Aktivierung von Distickstoff

Die Eigenschaften des Dünnschichtreaktors sind durch folgende Punkte charakterisiert:

- (1) Eine große Oberfläche des Eisensulfides wird durch einen dünnen Suspensionsfilm, der durch die Verteilerscheibe und den Rotor erzeugt wird, gewährleistet.

- (2) In der Kreislaufapparatur wird die Eisensulfid Suspension kontinuierlich umgepumpt.
- (3) Da der Großteil des Gerätes aus Glas bzw. Spezialkunststoffen, die sich inert gegenüber Stickstoff verhalten besteht, sollte die Stickstoffaktivierung nicht beeinflusst werden.
- (4) Das Doppelwandgefäß mit Thermostat und Heizflüssigkeit kann bei einer konstanten inneren Temperatur von 80°C betrieben werden.
- (5) Das Quarzrohr der UV-Lampe ermöglicht eine optimale Lichtdurchlässigkeit.

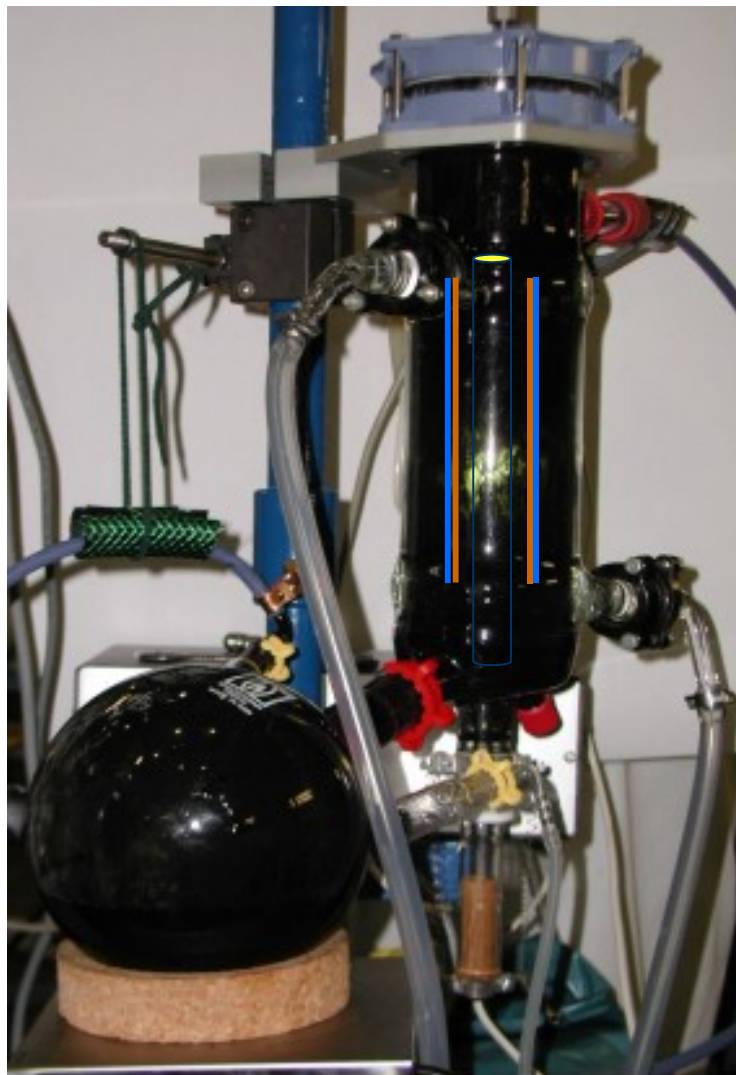


Abb. 23: Aufnahme der UV-Dünnschicht-Apparatur

Die höchste Ausbeute der durchgeführten Versuche im Pilot-Plant-Maßstab (Anhang B) lag bei 217 $\mu\text{mol NH}_3$ (= 3,7 mg) bei einem Ansatz von 3 Mol Eisensulfid und einer Reaktionstemperatur von 80°C für 60 Tage. Im Vergleich dazu konnten unter Einsatz von UV-Licht 54 $\mu\text{mol NH}_3$ (= 0,91 mg) bei einem Ansatz von 0,3 Mol Eisensulfid und 20 Tagen bei 80°C erreicht werden. Demzufolge konnte durch den Einsatz von UV-Licht die Ausbeute an Ammoniak deutlich erhöht werden.

Da bei dieser Reaktionsführung schon nach 20 Tagen verwendbare Ergebnisse erhalten werden konnten, wurden mit dieser Versuchsanordnung zusätzlich Experimente zur Bestimmung der Aktivität von Mischsulfiden durchgeführt.

	FeSO₄ [mmol]	M(SO₄) [mmol]	Na₂S [mmol]	Reaktionszeit [d]	Ausbeute NH₃ [μmol]
FeSO ₄	300	-	300	20	54
MnSO ₄	290	10	300	20	35
CoSO ₄	290	10	300	20	23
CuSO ₄	290	10	300	20	31
NiSO ₄	290	10	300	20	75

Tab. 2: Mischsulfid-UV-Versuche

In Tab. 2 wurden die erhaltenen Ergebnisse der Mischsulfid-Versuche, welche in der UV-Dünnschicht-Apparatur durchgeführt wurden, zusammengestellt. Die Daten zeigen, dass Mn(II)-, Co(II)- und Cu(II)-Salze offensichtlich im Vergleich zum ausschließlich mit Fe(II)-Ionen durchgeführten UV-Versuch, eher zu geringeren Ammoniak-Ausbeuten führen.

Die Ausnahme in dieser Messreihe bildet das Experiment mit einer FeNiS-Suspension. Hier wurde eine 1,4-fach höhere Ausbeute an Ammoniak erhalten.

Zur Analytik des Sulfides wurden von jedem Versuch Proben für die Röntgenpulverdiffraktometrie genommen. In allen Proben konnte neben Eisensulfid und

-disulfid auch die entsprechenden Übergangsmetallsulfide und zusätzlich Mischsulfide identifiziert werden (Abb. 24).

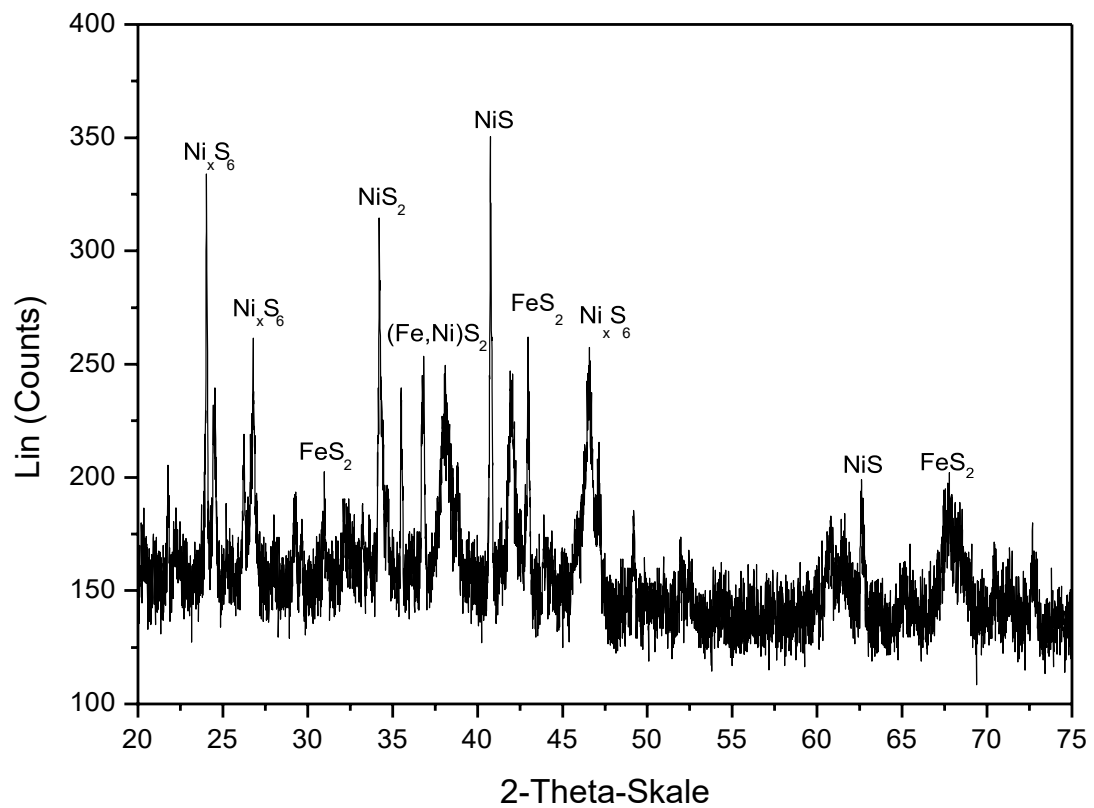


Abb. 24: Röntgenpulverdiffraktogramm einer 30:1-Mischung von Ni/FeS aus NiSO_4 , FeSO_4 und Na_2S (UV-Versuch)

6. Indirekte Optimierung mit Hilfe von Modellsystemen

Da die Reduktion von Stickstoff zu Ammoniak an der Eisensulfid-Oberfläche neben einer Reaktionszeit von 2 Wochen für die Fixierung des Distickstoffs eine mehrwöchige Vor- und Nachbereitungszeit benötigt, wurde nach Modellsystemen gesucht, an denen veränderte Parameter bei der Sulfidfällung bzw. beim Versuchablauf untersucht werden können.

Diese Untersuchungen bilden einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

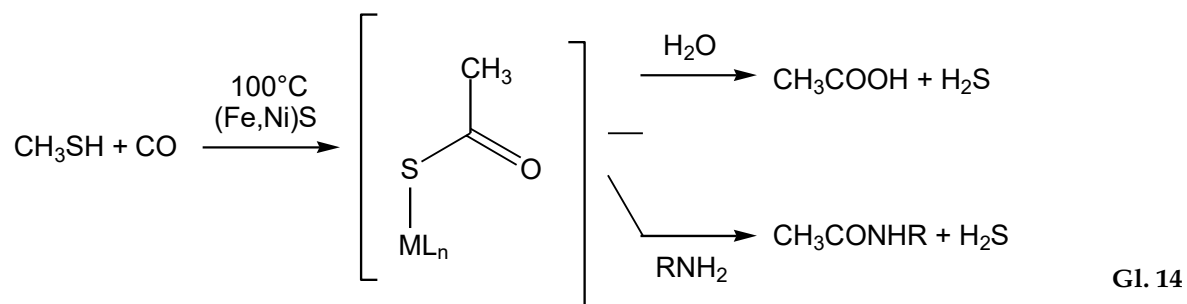
Dabei fiel unser Hauptinteresse auf die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren zu Aminosäuren am Beispiel des Natriumsalzes der Brenztraubensäure.

Da dieses System aber nicht 100 %-ig mit dem Hauptversuch auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsräume vergleichbar ist, erschien noch die Reduktion von Stickstoffmonoxid als dem N_2 „vergleichbares“ Gas erforderlich.

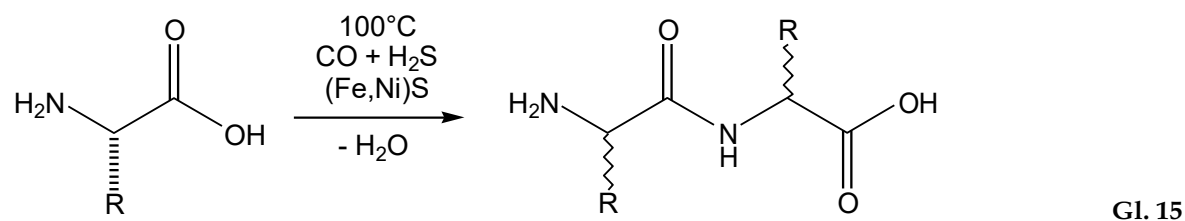
6.1 Phenylpyruvat

Wie im Kapitel 2.4 beschrieben, entwickelte G. Wächtershäuser eine Theorie zum chemoautotrophen Ursprung des Lebens. Um seine Hypothese zu untermauern, arbeitete er mit seiner Assistentin C. Huber an der Aufklärung des reduktiven Acetyl- Coenzym-A-Stoffwechselweges unter hydrothermalen Temperaturen.

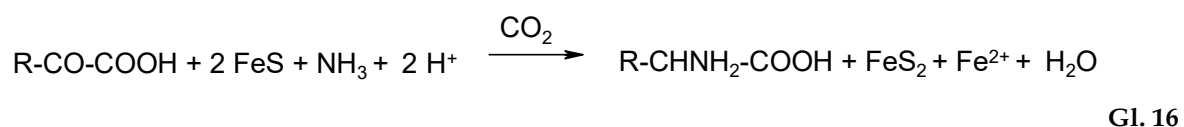
Sie setzten dazu Methylmercaptan in einer (Fe, Ni)S-Suspension mit Kohlenmonoxid zu einem aktiven Thioester $CH_3-CO-SML_n$ um, welcher in Folge zur Essigsäure hydrolysiert (Gl. 14). Die Aktivierung dieser Reaktion erfolgt durch die Acetyl- Coenzym-Synthetase, deren reaktives Zentrum Eisen- und Nickelionen enthält.



Unter ähnlichen Reaktionsbedingungen gelang es ihnen Aminosäuren zu racemischen Dipeptiden umzusetzen. Es handelt sich hierbei um eine Kondensation der Aminosäure an der Oberfläche des Eisen-Nickel-Sulfides (Gl. 15).



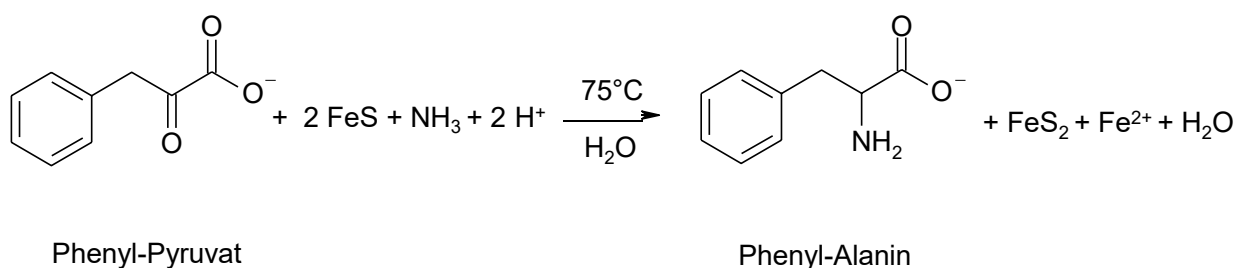
Hafenbradl et al. [64] berichteten 1995 über die Herstellung von Aminosäuren durch reduktive Aminierung von α -Keto-Säuren (Gl. 16).



Dabei wurden die Bildung der Aminosäuren Phenylalanin (27 % nach 6 Tagen), Phenylglycin (29 % nach 6 Tagen), Tyrosin (45 % nach 6 Tagen), aber auch aliphatischer Aminosäuren, wie Glycin (80 % nach 6 Tagen), Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin (2-8 % nach 6 Tagen) untersucht.

6.1.1 Reduktive Aminierung von Phenylpyruvat

Die von Hafenbradl et al. beschriebene reduktive Aminierung (Gl. 18) von Phenyl- pyruvat mit Ammoniumcarbonat bei einem pH-Wert von 8,5 zur entsprechenden Aminosäure findet bei einer Temperatur von 100°C und in Gegenwart von CO₂ statt. Spätere Arbeiten von C. Huber zeigten, dass auf CO₂ verzichtet und als „Ammoniumquelle“ Ammoniumchlorid eingesetzt werden kann. Außerdem konnten deutlich bessere Ergebnisse erhalten werden, wenn statt getrocknetem Eisensulfid frisch gefälltes, amorphes Eisensulfid eingesetzt wurde. Die Fällung erfolgte aus einer wässrigen Eisen(II)-sulfatlösung. Die Reaktionstemperatur von 75°C lag unter den von Hafenbradl et al. verwendeten 100°C. Mit wässriger NaOH-Lösung wurde pH = 9 eingestellt. Dies entspricht dem pK_s-Wert der Aminosäure Phenylalanin (pK_s = 9,24) [65], welche als Produkt der reduktiven Aminierung (Gl. 18) von Phenylpyruvat entspricht.



Gl. 18

Die Versuche von C. Huber und Hafenbradl et al. erfolgten in Serumflaschen, die mit Stickstoff gespült wurden. Nach einer Reaktionszeit von sechs Tagen erhielten Hafenbradl et al. eine Ausbeute an Aminosäure von 18 %, während mit frisch gefälltem FeS nach bereits 17 Stunden eine Ausbeute von 40 - 55 % zu verzeichnen ist.

Da Reaktionen zur reduktiven Aminierung von α -Ketosäuren schon z.B. von Wächtershäuser et al. gut untersucht wurden, stehen eine Vielzahl an Vergleichsdaten zur Verfügung. Die bekannte Versuchsvorschrift konnte unkompliziert auf unsere

eigenen Bedingungen angepasst werden. Da schon nach 5 Stunden Reaktionszeit gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden können, sollte an diesem Modellsystem die Aktivität von Metallsulfiden getestet werden. Die dabei gemachten Erfahrungen sollten in den Hauptversuch im Pilot-Plant-Maßstab übertragen werden.

Es wurde deshalb folgender Versuch entwickelt:

Um einen Sauerstoffausschluss zu gewährleisten, wurden für die von uns, nach dem oben beschriebenen Vorbild, durchgeführten Versuche Schlenkgefäße, die vollständig evakuiert und dann mit Stickstoff gefüllt wurden, verwendet.

Für die Herstellung sämtlicher Ausgangslösungen wurde hochreines Wasser, das mit Stickstoff gesättigt wurde, verwendet. Ausgangslösungen waren unter anderem eine 1M Na_2S -Lösung, 4n NaOH-Lösung (zum Einstellen des pH-Wertes auf 9) und eine 0,1M Phenylpyruvatlösung.

Die Ansatzgröße wurde für dieses Modellsystem mit 20 ml Gesamtlösung sehr gering gehalten.

Standardansatz:

Für jeden einzelnen Ansatz wurden zunächst 4 mmol des $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 30 mmol NH_4Cl frisch eingewogen und mit Stickstoff gesättigtes Wasser unter ständigem Rühren gelöst. Anschließend wurde zu dieser Lösung 4 ml der 1M Na_2S -Lösung zugegeben und schwarzes Eisensulfid ausgefällt. Mittels Röntgendiffraktometrie konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass unter den verwendeten Bedingungen das Eisensulfid amorph vorliegt [Abb. 25].

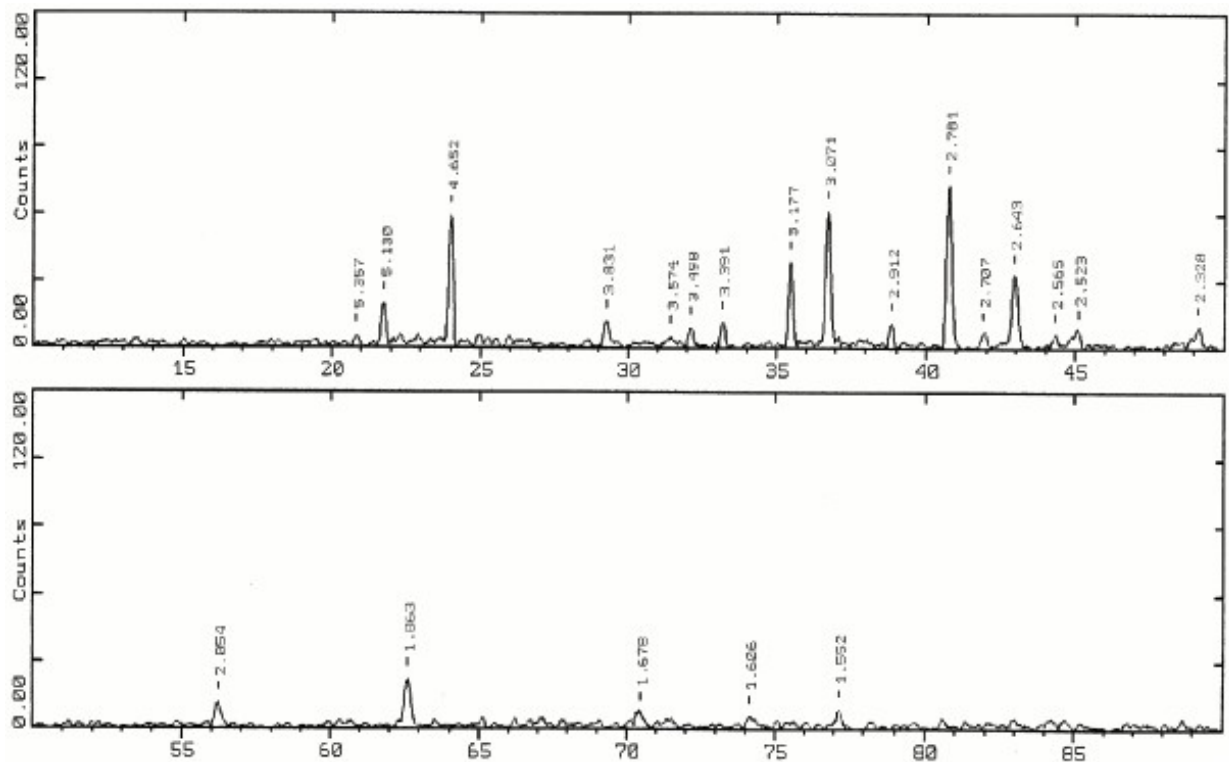


Abb. 25: Röntgenpulverdiffraktogramm von frisch gefälltem Eisensulfid mit FeK α -Strahlung [70]

Durch Zugabe von 4 n NaOH-Lsg. wurde nun der pH-Wert auf 9 eingestellt. Im Anschluss daran wird die Phenylpyruvatlösung zu der FeS-Suspension gegeben und für 5 Stunden bei 75°C gerührt. Die Analyse der flüssigen Phase erfolgte nach dem Abfiltrieren des festen schwarzen Bodensatzes mittels HPLC.

6.1.2 Kinetische Untersuchungen

Zur möglichen Klärung des Reaktionsmechanismus einer Reaktion, die möglicherweise an der Eisensulfid-Oberfläche abläuft bzw. von Eisensulfid katalysiert wird, wurden kinetische Untersuchungen zum Einfluss von Reaktionszeit, -temperatur und Eduktkonzentration durchgeführt (Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5).

Versuchsdauer [h]	Phenylalanin [μmol]	Ausbeute [%]
1	429	21
2	676	34
3	706	35
4	724	36
5	827	41
17	1167	59
168	1646	83

Tab. 3: Einfluss der Reaktionszeit auf die Ausbeute an Phenylalanin

Versuchsdauer [h]	Reaktionstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Phenylalanin [μmol]	Ausbeute [%]
5	80	706	42
17	55	803	44
17	80	912	54
17	120	1443	79

Tab. 4: Einfluss der Reaktionstemperatur

Phenylpyruvat [mmol]	Phenylalanin [mmol]	Ausbeute [%]
0,40	1,38	69
0,60	1,41	52
0,80	1,73	52
1,00	1,57	41

Tab. 5: Einfluss der Eduktkonzentration

Neben Einzelversuchen wurden auch Dauerversuche mit dreifacher Ansatzgröße durchgeführt. Dabei wurden stündlich Proben entnommen und sofort vermessen.

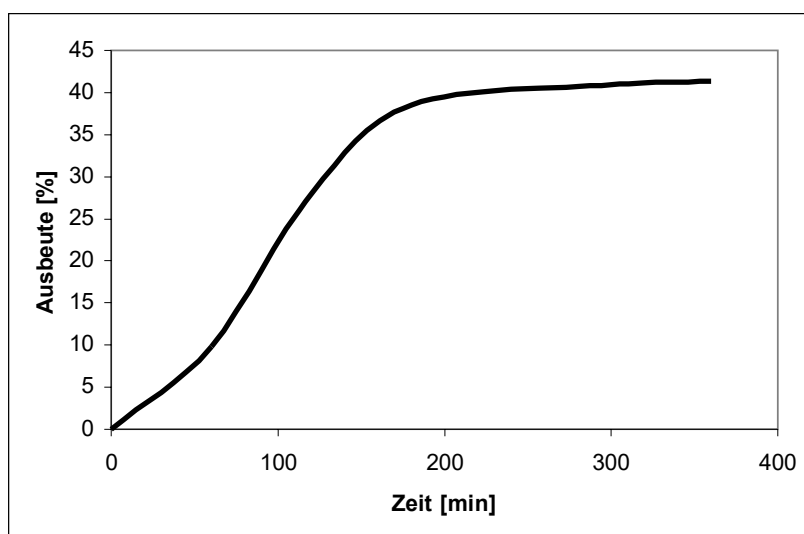


Abb. 26: Reaktionsverlauf über 6 Stunden

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die anfänglich zügige Umsetzung des Edukts bereits nach 4 Stunden abklingt und sich einem Plateau annähert.

Im Folgenden soll anhand der Methode der integrierten Geschwindigkeitsgesetze die Reaktionsordnung der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat geklärt werden. Eine Abhängigkeit pseudo erster Ordnung sollte eintreten, falls die Reaktion über die Zwischenstufe des entsprechenden Imins verläuft, welches anschließend von Eisen an der Oberfläche der festen Phase komplexiert wird. Eine Reaktion pseudo zweiter Ordnung in Bezug auf das Edukt wäre zu erwarten, wenn an einem Eisen-Zentrum zwei Imin-Moleküle koordinieren würden [66].

Ordnung	Reaktion	Geschwindigkeitsgesetz	Integriertes Geschwindigkeitsgesetz	Auswertung
1	$A \rightarrow P$	$d[P]/dt = k[A]$	$[P] = [A]_0 \exp(kt)$	$kt = \ln([A]_0/[A]_0 - [P])$
2	$2 A \rightarrow P$	$d[P]/dt = k[A]^2$	$kt = [P]/[A]_0([A]_0 - [P])$	$kt = [P]/[A]_0([A]_0 - [P])$

Tab. 6: Geschwindigkeitsgesetze [67]

Dabei steht [P] für die Konzentration des Produktes Phenylalanin und $[A]_0$ für die Anfangskonzentration des Eduktes Phenylpyruvat.

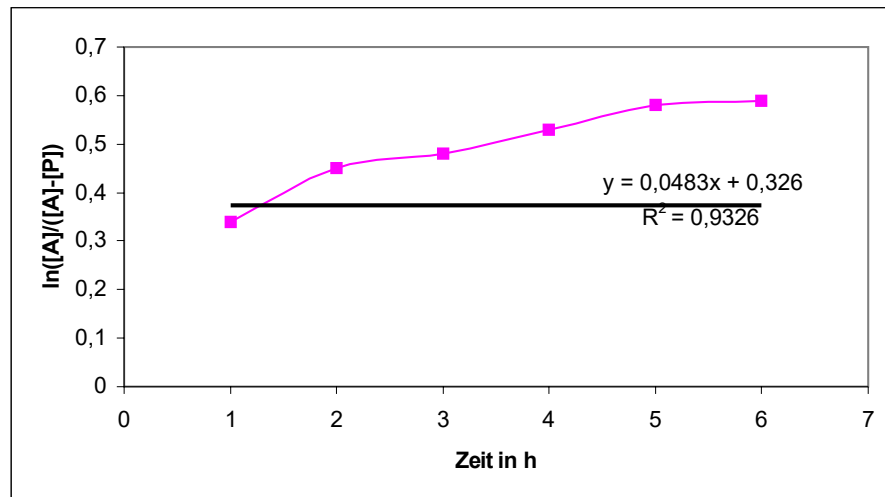


Abb. 27: Auswertung der Kinetik-Daten nach dem Geschwindigkeits-Gesetz pseudo erster Ordnung

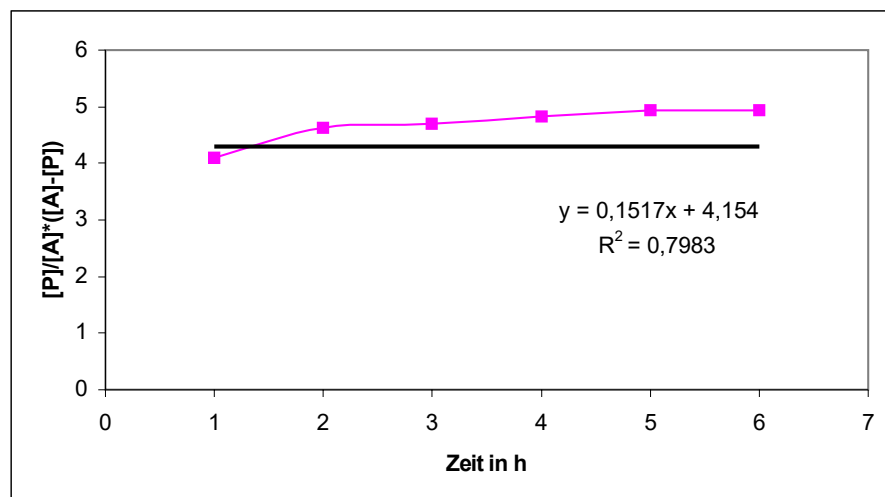


Abb. 28: Auswertung der Kinetik-Daten nach dem Geschwindigkeits-Gesetz pseudo zweiter Ordnung

Der Korrelationskoeffizient R^2 für die im natürlichen Logarithmus aufgetragene Konzentration der Aminosäure (Abb. 27) zeigt eine bessere Annäherung der Gerade an die Messpunkte, als die reziprok aufgetragene Konzentration (Abb. 28). Demnach und

wegen der Verwendung von Ammoniumchlorid als NH_2 -Gruppen-Lieferant im Überschuss ist die reduktive Aminierung von Phenylpyruvat als Reaktion erster Ordnung zu sehen.

Das Geschwindigkeitsgesetz für diese Reaktion lautet also:

$$d[\text{ph-ala}]/dt = 0,0483 \text{ s}^{-1} * [\text{ph-py}]$$

Folglich wäre nachstehender Reaktionsverlauf denkbar:

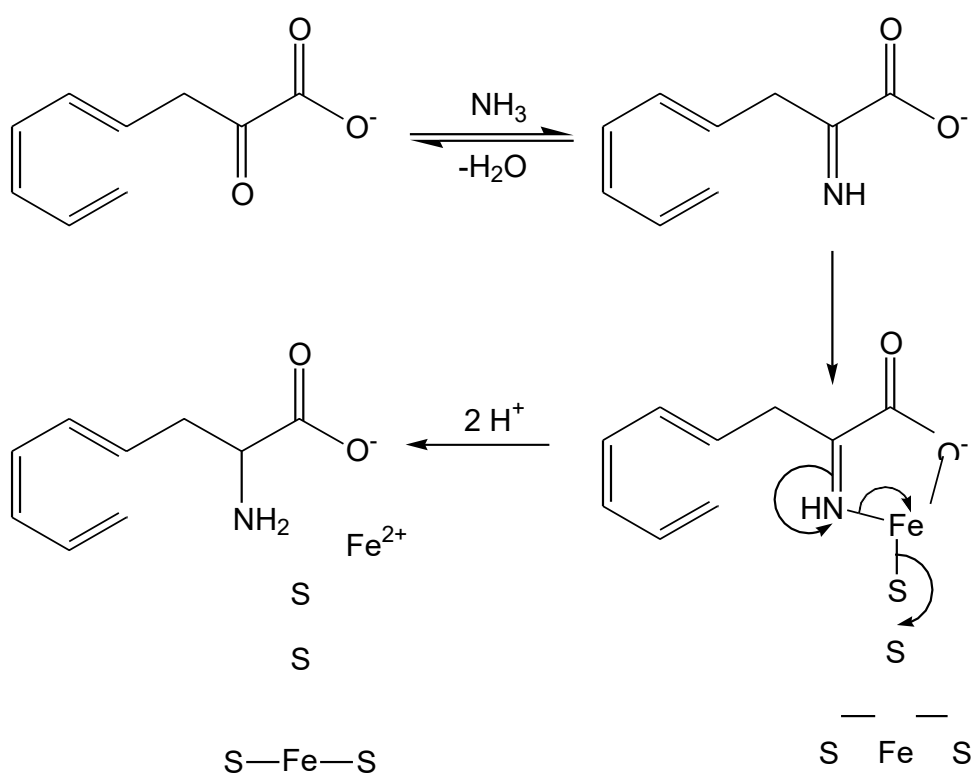


Abb. 29: Mögliches Formelschema für eine Reaktion erster Ordnung bezogen auf Phenylpyruvat

Im ersten Reaktionsschritt wird Phenylpyruvat mit Ammoniak zu dem entsprechenden Imin umgesetzt. Das Gleichgewicht liegt in der wässrigen Lösung ganz auf der Seite des Edukts. Das Imin des Phenylpyruvats kann dann im zweiten Reaktionsschritt von Eisen an

der Oberfläche der festen Phase komplexiert werden. Durch Übertragung von zwei

Elektronen aus dem von Eisen koordinierten Sulfid-Ion wird das Imin zur Aminosäure reduziert. Das entstehende Schwefelatom reagiert mit einem weiteren Sulfid-Ion zu einem Disulfid-Ion (S_2^{2-}), das weiterhin an Eisen koordiniert ist. Dabei wird Fe^{2+} in die Lösung freigesetzt [68].

Bei der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat können neben dem Hauptprodukt Phenylalanin die Nebenprodukte Phenylpropionsäure und Zimtsäure entstehen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Versuche ohne „Ammoniumquelle“ durchgeführt. Wie erwartet wurde das Phenylpyruvat zu Phenylpropionsäure reduziert (Abb. 30).

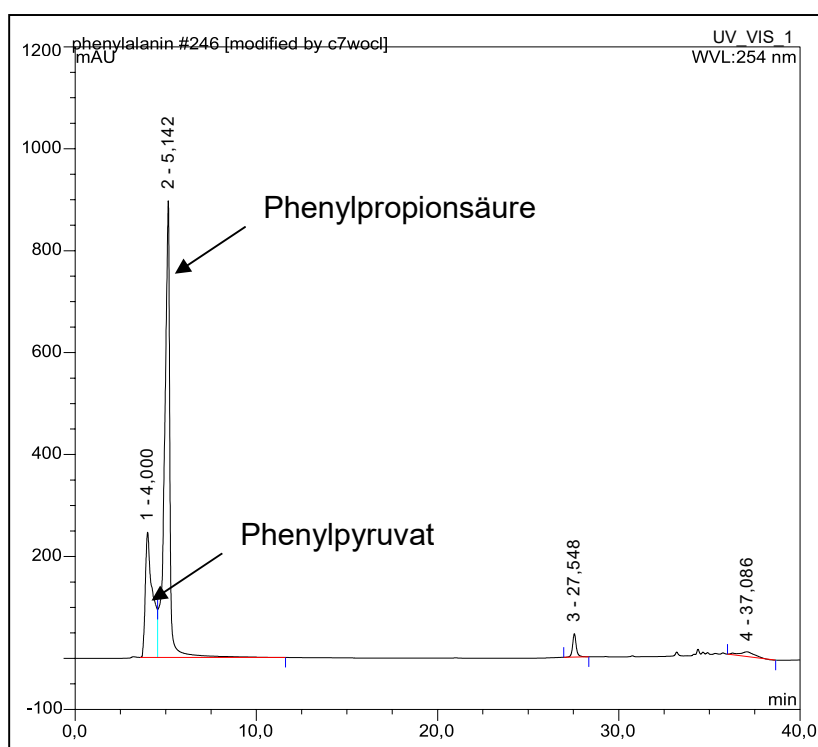


Abb. 30: HPL-Chromatogramm - Phenylpropionsäure

Um sicher zu gehen, dass Phenylpropionsäure Nebenprodukt und nicht nur eine Zwischenstufe der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat ist, wurde ebenfalls versucht 3-Phenylpropionsäure reduktiv zu Aminieren. Die anschließende analytische Untersuchung zeigte, dass bei diesem Experiment keine Reaktion der Phenylpropionsäure stattgefunden hat.

Die zahlreichen gut reproduzierbaren Versuche bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. So ist zwar der Einfluss von Eisensulfid in der Reaktion schon mehrfach nachgewiesen.

Aber warum sollten nicht auch andere Übergangsmetalle vorzugsweise in Kombination mit Eisen und Schwefel, wie man es im aktiven Zentrum des Nitrogenaseenzym findet, als Katalysatoren für diese Reaktion in Frage kommen?

6.1.3 Reduktion mit Mischsulfiden

Neben Eisen zeigen bekannter Weise auch andere Übergangsmetalle katalytische Aktivität. So verwendeten Wächtershäuser et al., wie in Gl. 14 und 15 gezeigt, ein Eisen- Nickel-Mischsulfid, welches reaktives Zentrum der Acetyl-Coenzym-Synthetase ist.

An dem Modellsystem der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat zur entsprechenden Aminosäure Phenylalanin sollte die Aktivität weiterer Metallsulfide unterschiedlicher Zusammensetzung getestet werden. Für diese Mischsulfid-Versuche wurden zunächst Mangan(II)-, Cobalt(II)-, Kupfer(II)- und Nickel(II)-salze verwendet. Die verschiedene Metall(II)-salze wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (Eisen/Metall : 1/1, 15/1 (30/1)) mit dem Eisen(II)-Sulfat gemischt. Anschließend wird, wie oben beschrieben, zunächst das jeweilige Mischsulfid mittels Natrium-Sulfid ausgefällt und die Phenylpyruvat-Lösung zugegeben. Auf Grund der Beobachtungen über das Reaktionszeitverhalten der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat wurde zunächst eine Reaktionszeit von 5 Stunden bei 80°C unter ständigem Rühren der Reaktionsmischung festgelegt. Ergänzend wurden auch Versuche mit 17 Stunden oder längere Reaktionszeiten durchführt. Die daraus resultierenden Erfahrungen wurden auch zum Teil in größere Ansätze, wie z. B. Versuche zur Reduktion von molekularem Stickstoff an der Eisensulfid-Oberfläche im UV-Dünnschicht-Reaktor oder sogar in den Versuch im Pilot-Plant-Maßstab übertragen.

	Fe:M	FeSO ₄ [mmol]	M(II)-Salz [mmol]	Phenylalanin [mmol]	Ausbeute [%]
MnSO₄	1:1	2	2	0,64	106
	15:1	3,75	0,25	0,65	108
	30:1	3,875	0,125	0,68	112
MnCl₂	1:1	2	2	0,57	96
	15:1	3,75	0,25	0,62	105
	30:1	3,875	0,125	0,54	92
CoSO₄	1:1	2	2	0,36	53
	15:1	3,75	0,25	0,39	59
	30:1	3,875	0,125	0,47	70
CoCl₂	1:1	2	2	0,35	62
	15:1	3,75	0,25	0,34	61
	30:1	3,875	0,125	0,37	65
CuSO₄	1:1	2	2	-	-
	15:1	3,75	0,25	0,57	97
	30:1	3,875	0,125	0,63	106
CuCl₂	1:1	2	2	-	-
	15:1	3,75	0,25	0,57	79
	30:1	3,875	0,125	0,61	85
NiSO₄	1:1	2	2	-	-
	15:1	3,75	0,25	0,38	80
	30:1	3,875	0,125	0,41	87
NiCl₂	1:1	2	2	-	-
	15:1	3,75	0,25	0,78	87
	30:1	3,875	0,125	0,81	91

Tab. 7: Mischsulfid-Versuche (5h, 80°C)

	Fe:M	FeSO ₄ [mmol]	M(II)-Salz [mmol]	Phenylalanin [mmol]	Ausbeute [%]
MnSO₄	1:1	2	2	0,66	58
	15:1	3,75	0,25	0,94	82
	30:1	3,875	0,125	1,03	90
MnCl₂	1:1	2	2	0,74	65
	15:1	3,75	0,25	0,97	86
	30:1	3,875	0,125	1,04	91
CoSO₄	1:1	2	2	0,28	24
	15:1	3,75	0,25	0,56	49
	30:1	3,875	0,125	0,66	58
CoCl₂	1:1	2	2	0,24	22
	15:1	3,75	0,25	0,70	63
	30:1	3,875	0,125	0,92	84
CuSO₄	1:1	2	2	0,04	4
	15:1	3,75	0,25	1,09	99
	30:1	3,875	0,125	1,11	101
CuCl₂	1:1	2	2	0,45	41
	15:1	3,75	0,25	1,07	97
	30:1	3,875	0,125	1,06	96
NiSO₄	1:1	2	2	0,04	3
	15:1	3,75	0,25	0,86	74
	30:1	3,875	0,125	1,00	86
NiCl₂	1:1	2	2	0,16	14
	15:1	3,75	0,25	1,00	86
	30:1	3,875	0,125	1,01	87

Tab. 8: Mischsulfid-Versuche (17h, 80°C)

In Tab. 7 und Tab. 8 wurden die Ergebnisse der Mischsulfid-Versuche zusammengefasst. Dabei wurde die Ausbeute jeweils auf einen analogen Grundversuch (4 mmol FeSO_4) bezogen. Die Reaktionszeit wurde auf 5 h und 17 h bei 80°C festgelegt.

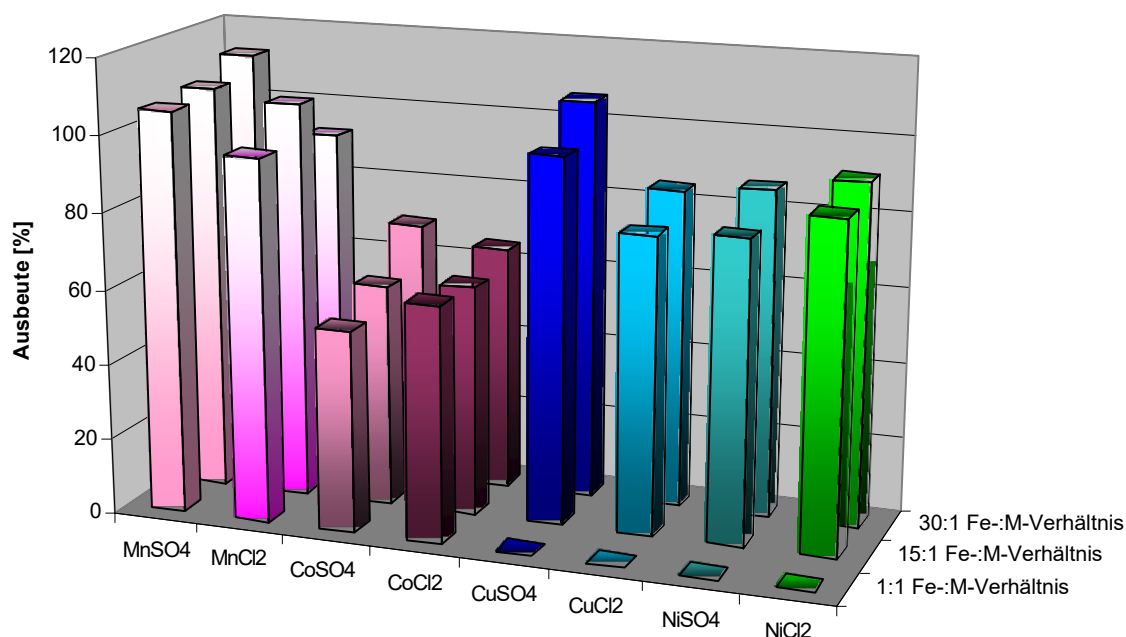


Abb. 31: Übersicht über Mischsulfid-Versuche (5 h Reaktionszeit) $\text{FeS} = 100\%$

Die Daten zeigen für die Versuche mit MnSO_4 bei allen Konzentrationsverhältnissen höhere Ausbeuten im Vergleich zu den Versuchen, in denen ausschließlich FeSO_4 durchgeführt wurden. Dennoch lässt sich hier schon ein Trend zu höheren Ausbeuten an Phenylalanin erkennen, je geringer der Anteil an Mn(II) -Salz ist. Dieses wird bei den Versuchen mit Cu(II) - und Ni(II) -Salzen besonders deutlich. Hier konnte bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 von FeSO_4 mit Cu(II) - oder Ni(II) -Salzen nach 5 Stunden Reaktionszeit noch kein Produkt nachgewiesen werden. Bei den beiden anderen Mischungsverhältnissen werden Ausbeuten, die 80 bis 100 % im Vergleich zu den FeSO_4 -Versuchen entsprechen, erhalten. Nur die Versuche mit den Co(II) -Salzen

erhalten deutlich geringere Ausbeuten, welche zwischen 50 und 70 % angesiedelt sind (Abb. 31).

Auch wenn die Reaktionsgeschwindigkeit nach den ersten 5 Stunden nachlässt, wurden analoge Untersuchungen mit einer Reaktionszeit von 17 Stunden bei 80°C durchgeführt. Dabei werden im Allgemeinen höhere Absolutmengen an Phenylalanin gefunden. In Analogie zu den Versuchen, die ausschließlich mit FeSO_4 durchgeführt wurden, kann man die Ausbeuten nicht uneingeschränkt vergleichen.

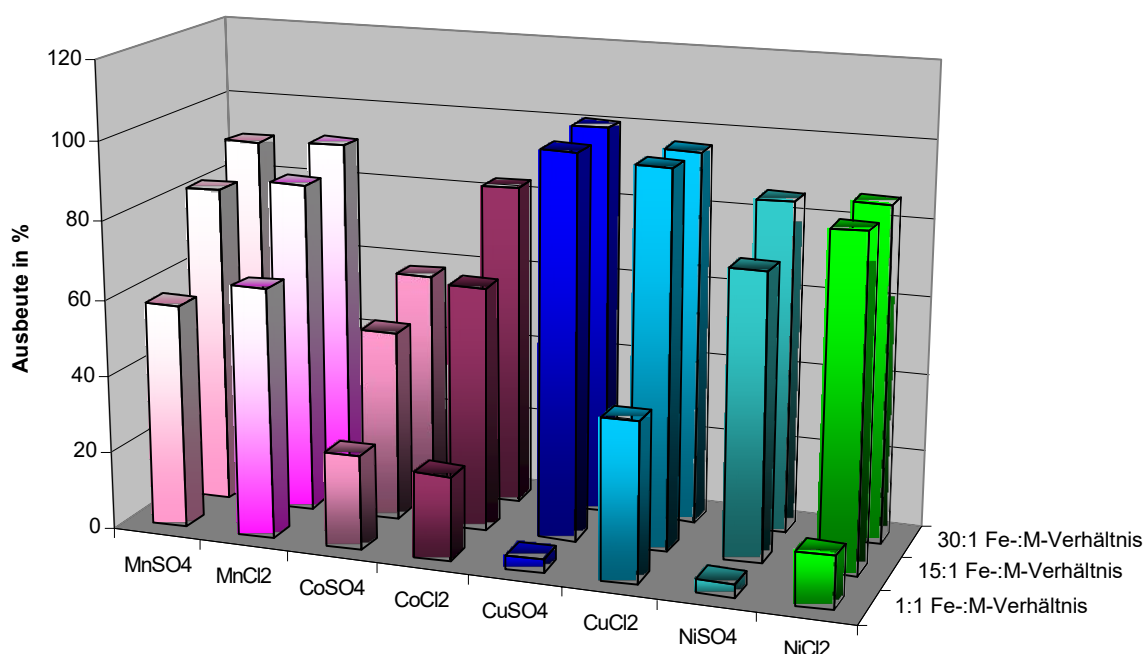


Abb. 32: Übersicht über Mischsulfid-Versuche (17 h Reaktionszeit) $\text{FeS} = 100\%$

Bei einer Reaktionszeit von 17 Stunden wurden bei den Mn(II)- und Co(II)-Salzen überwiegend geringere Ausbeuten, bei Cu(II)- und Ni(II)-Salzen vorwiegend höhere oder zumindest analoge Ausbeuten im Vergleich zu den Ergebnissen bei 5 Stunden Reaktionszeit (Abb. 32).

Metallsulfid-Suspensionen ohne Eisenanteil, d.h. nur aus MnS, CoS, CuS oder NiS bestehend, führten bei gleichen Reaktionsbedingungen nicht zum gewünschten Produkt bzw. fand keine Umsetzung des Eduktes statt.

Für die Entwicklung der Synthesestrategie zur Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak an einer Eisensulfid-Oberfläche haben wir uns immer wieder an bekannter Literatur und auch an der Natur (Nitrogenaseenzym) orientiert. Wie unter 3.2.1 beschrieben, liegt im reaktiven Zentrum des Nitrogenaseenzym neben Eisen auch Molybdän oder Vanadium vor. Aus diesem Grund wurden vergleichbare Untersuchungen mit Molybdän bzw. Vanadium in Verbindung mit Eisen durchgeführt. Die Realisierung gestaltete sich schwierig, da sich die gewählten Verbindungen MoO_3 und V_2O_5 nur schlecht bzw. unvollständig in Wasser lösen. Daher wurde MoO_3 durch $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ und V_2O_5 durch NaVO_3 ersetzt. Allerdings ergaben sich jetzt Probleme bei der pH-Wert-Einstellung.

Die Ergebnisse der Mischsulfid-Experimente zeigten, dass die untersuchten Übergangsmetalle in geringen Konzentrationen (30:1 Fe-M-Verhältnis) eingesetzt (mit Ausnahme von Cobalt) zu vergleichbaren Ausbeuten führen, wie die Experimente ohne weiteres Metall außer Eisen. Bei Einsatz von Mn(II)-Salzen als Kombinationspartner zu FeSO_4 wurden sogar höhere Ausbeuten erhalten.

Wurden die Übergangsmetalle in höheren Konzentrationen verwendet (15:1 und besonders bei 1:1 Fe:M-Verhältnis), wurden deutlich geringere Ausbeuten an Phenylalanin gemessen.

Speziell die Versuche mit Molybdän- oder Vanadium-Eisen-Mischsulfiden ergaben nur mäßige Ausbeuten, welche zudem nicht reproduzierbar waren.

Auf den Hauptversuch wurde deshalb nur die Kombination von 30:1 FeSO_4 : MnSO_4 übertragen.

Aufgrund technischer Pannen konnte dieser Versuch leider nicht ordnungsgemäß und Inert über die gesamte Reaktionsdauer durchgeführt werden.

6.1.4 Modellversuche zur Reduktion mit UV-Licht

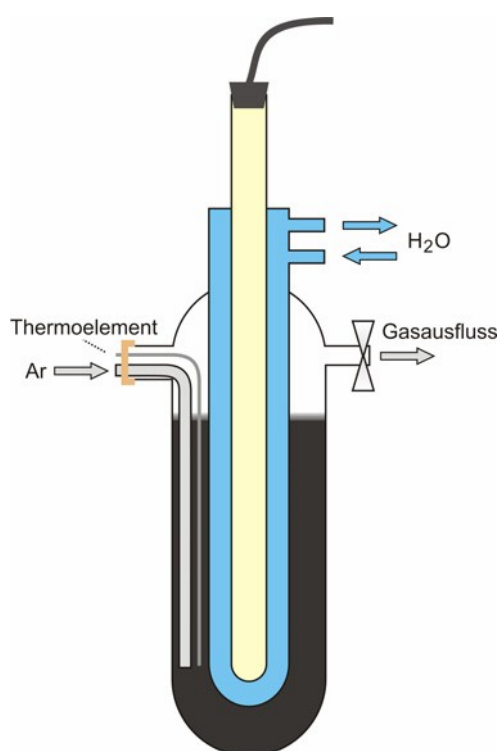


Abb. 33 UV-Versuchsaufbau

Kisch et al. gelang es einen Eisentitanat-Film ($\text{Fe}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$) auf einem Glas-Träger abzuscheiden. Bei photochemischer Anregung vermag dieser Eisentitanat-Film molekularen Stickstoff zunächst zu Ammoniak zu reduzieren und anschließend zu Nitrat zu oxidieren [69]. Um weitere Parallelen zum Hauptversuch ziehen zu können, und den Einfluss von UV-Licht auf die reduktive Aminierung von Phenylpyruvat zu untersuchen, wurde auch am Modellsystem Reaktionen unter UV-Licht-Bestrahlung mit einer 150 Watt Quecksilberdampf Lampe durchgeführt.

Dazu wurde der in Abb. 33 gezeigte Versuchsaufbau verwendet. Da die Ansatzgröße für diese Versuche auf 70 ml erhöht wurde, führte ich zusätzlich Blindversuche ohne UV-

Licht in der Apparatur durch. Im Gegensatz zum UV-Versuch im Dünnschichtreaktor ist bei diesem Versuchsaufbau die Eindringtiefe der UV-Strahlung erheblich geringer. Aus diesem Grund können keine quantitativen Vergleiche zwischen den beiden Bestrahlungsversuchen durchgeführt werden. Nach Abschluss der Untersuchungen zeigte sich, dass mit UV-Licht-Bestrahlung unerwartete geringere Ausbeuten an Phenylalanin im Vergleich zu Versuchen identischer Ansatzgröße und Reaktionsbedingungen, aber ohne photochemische Anregung erhalten wurden (Tab. 9).

	Reaktionszeit [h]	Phenylalanin [μmol]	Ausbeute [%]
mit UV-Licht	4	0,70	34
ohne UV-Licht	4	0,71	34
mit UV-Licht	5	0,62	31
ohne UV-Licht	5	0,83	41
mit UV-Licht	9	0,50	25
ohne UV-Licht	9	0,59	30
mit UV-Licht	24	0,91	44
ohne UV-Licht	24	1,16	57

Tab. 9: Übersicht Versuche zur reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat mit UV-Licht-Bestrahlung

Da bei allen Versuchen mit analoger Ansatzgröße und gleichen Reaktionsbedingungen gearbeitet wurde, müssten bei photochemischer Irrelevanz zumindest vergleichbare Ergebnisse bei Reaktionen mit und ohne UV-Licht erhalten werden.

Die unterschiedlichen Ausbeuten resultieren aus der verstärkten Nebenreaktion von Phenylpyruvat zu Phenylpropionsäure. Die erhalten HPLC-Chromatogramme zeigen neben Peaks für Phenylpyruvat und Phenylalanin auch einen Phenylpropionsäurepeak bei den Reaktionen mit UV-Licht-Bestrahlung. Da die Peaks für das Edukt Phenylpyruvat und für Phenylpropionsäure auch bei einem Fluß von 0,5 ml/min nicht sauber getrennt werden können, konnten leider keine Aussagen über die genaue Ausbeute an Phenylpropionsäure getroffen werden.

6.1.5 Produkt-Analytik

Die Analyse der Aminosäure Phenylalanin kann ohne weitere Derivatisierung mit der Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden. Dabei wird eine Säule vom Typ Eurosphere 100 – C18 eingesetzt.

Zeit in min	Eluent
0 – 10	Wasser/Methanol = 80/20 (isokratische Phase)
11 – 30	Wasser/Methanol = 80/20 auf Wasser/Methanol = 10/90 (linearer Gradient)
30 – 35	
35 – 40	Wasser/Methanol = 10/90 auf Wasser/Methanol = 80/20
	Wasser/Methanol = 80/20
	Fluß: 0,5 ml/min

Tab. 10: Eluentenverhältnisse zur HPLC-Analytik

Die Detektion erfolgt mit einem UV/VIS-Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm. Diese Wellenlänge erlaubt eine optimale Erkennung des Phenyl-Restes des Eduktes, Produktes und auch der Nebenprodukte. Als mögliche Nebenprodukte kommen Phenylpropionsäure und Zimtsäure bei dieser Reaktion in Frage.

Dieser spezielle Detektor erlaubt eine simultane Detektion bei vier Wellenlängen mit einer Wellenlängengenauigkeit von $\pm 0,75$ nm im UV-Bereich und die Aufnahme von 3D-Feldern. Die Software ermöglicht eine parallele Auswertung von HPLC-Chromatogramm (Abb. 34) und dazugehörigen UV-Spektren.

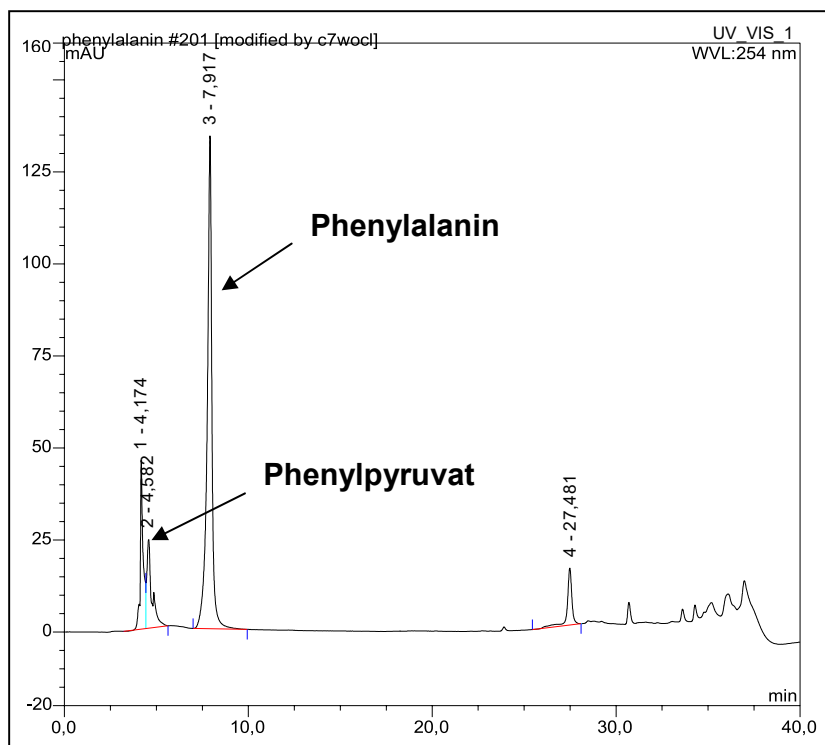


Abb. 34: HPLC-Chromatogramm

Im Chromatogramm (Abb. 34) zeigt das Edukt Phenylpyruvat 2 Peaks (4,2 min und 4,5 min) wegen seiner Keto-Enol-Tautomerie. Das Produkt Phenylalanin ist mit einer Retentionszeit von 7,9 min deutlich getrennt vom Edukt.

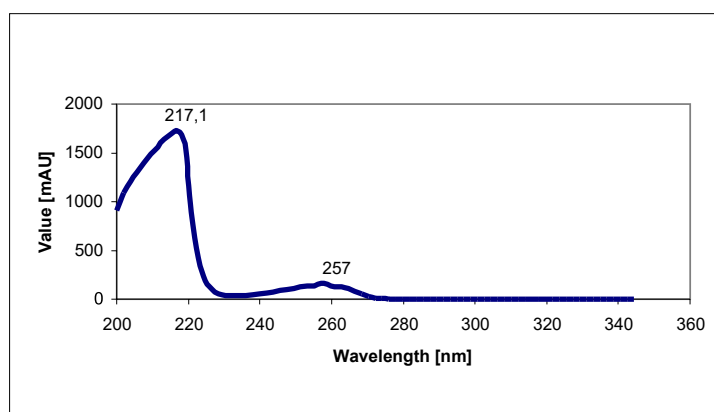


Abb. 35: UV-Spektrum von Phenylalanin

Sowohl der Phenylpyruvat-Peak, wie auch der Phenylalanin-Peak wurden durch Vergleichsmessungen von Standards zweifelsfrei charakterisiert.

6.1.6 Untersuchungen des frisch gefällten Eisensulfids

Die Bildung von Pyrit konnte durch Röntgendiffraktometrie zweifelsfrei nachgewiesen werden. Das Pulverdiffraktogramm wurde mit einer $\text{FeK}\alpha$ -Röhre ($\text{FeK}\alpha=1,9373 \text{ \AA}$) aufgenommen, um ungewollte Dispersionseffekte des Eisens zu vermeiden. In Pulverdiffraktogrammen von frisch gefälltem Eisensulfid konnte kein kristallines Eisendisulfid nachgewiesen werden – das Eisensulfid liegt ausschließlich amorph vor [70].

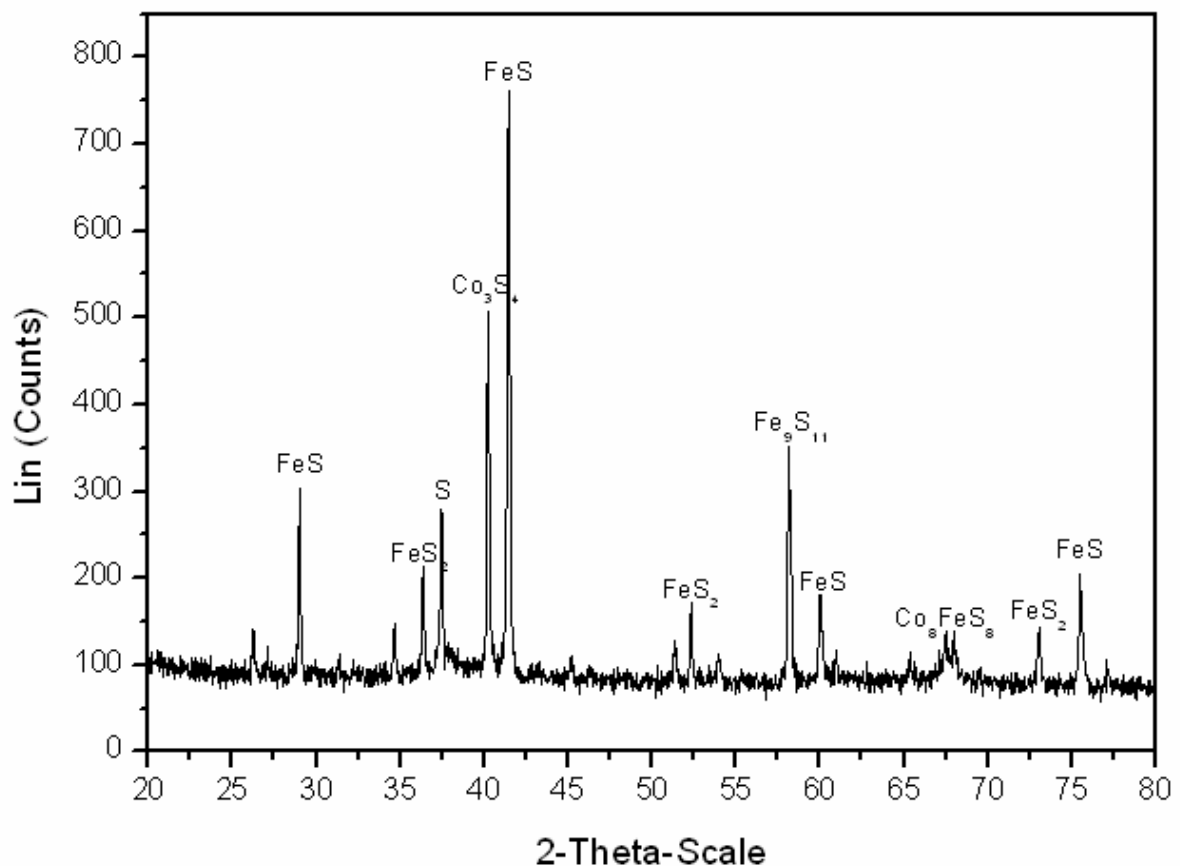


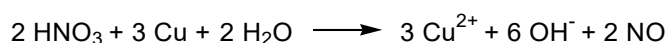
Abb. 36: Röntgenpulverdiffraktogramm einer 1:1-Mischung von Co/FeS aus CoCl_2 , FeSO_4 und Na_2S

Abb. 36 zeigt ein Beispiel für ein Röntgenpulverdiffraktogramm einer Übergangsmetall-Mischsulfid-Suspension nach der Reaktion. Es wurde eine Vielzahl von Proben mit verschiedenen Mischungsverhältnissen der Übergangsmetalle zur röntgenpulverdiffraktometrischen Untersuchung gegeben. In allen Proben konnte Eisensulfid-, Eisendisulfid-, Übergangsmetallsulfid- und auch Mischsulfid-Peaks identifiziert werden.

6.2 Reduktion von NO_x an der Eisensulfid-Oberfläche

Wie sich leider zeigte, kann man die durchgeführten Modellversuche mit Phenylpyruvat nicht direkt mit der Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak vergleichen. Daher wurde nach weiteren Modellsystemen gesucht.

Zu diesem Zweck wurde die Reduktion an der Eisensulfid-Oberfläche anhand des im Vergleich zu Distickstoff sehr reaktionsfreudigen Stickstoffmonoxid (NO) untersucht. Hierfür wurde zunächst Stickstoffmonoxid durch tropfenweise Zugabe von halbkonzentrierter Salpetersäure auf Cu-Späne frisch hergestellt. Da das entstehende NO durch Luftsauerstoff zu NO₂ oxidiert wird, musste die Apparatur mit Stickstoff bzw. Argon gespült werden.



Gl. 19

Edelmetalle, wie Kupfer, Silber und Quecksilber werden von halbkonzentrierter Salpetersäure oxidiert, welche dadurch zu Stickstoffmonoxid reduziert wird [71]. Um das in geringen Spuren entstehende N₂O aus dem Gasstrom zu filtern, wurde das entstandene NO durch einen leichten Stickstoff bzw. Argonstrom durch H₂O und anschließend unter Rühren bei 80°C und einem pH-Wert von 3 durch eine 0,1 molare Eisensulfid-Suspension geleitet. Nachdem die Kupferspäne verbraucht waren und kein NO mehr entstand, wurde der pH-Wert auf 10 umgestellt, der entstandene Ammoniak

in einem Stickstoff- bzw. Argonstrom ausgetrieben und in einer n/1000 H₂SO₄ aufgefangen (Tab. 11). Mittels Merck-Test Aquaquant® konnte Ammoniak schon nach 2 Stunden nachgewiesen werden. Der quantitative Ammoniak-Nachweis wurde mittels UV-Enzym-Test durchgeführt.

Cu-Späne [mmol]	NH ₃ [mmol]
79	1
157	2

Tab. 11: Bildung von Ammoniak an der Eisensulfid-Oberfläche

Die Versuchsdurchführung verlief wie oben beschrieben analog zum Stickstoff-Reduktionsversuch, brachte aber schon nach wenigen Stunden nachweisbare Ammoniakmengen. Dennoch können diese Experimente lediglich der Orientierung dienen, da hier die Menge des verwendeten Stickstoffmonoxid bisher nur sehr ungenau angegeben bzw. nicht bestimmt werden kann.

6.3 Reduktion mittels „Micellen“-Eisensulfid

Im Rahmen der komplexen Aufgabenstellung dieses Projektes wurde unter anderem versucht die Oberfläche von Eisensulfid zu vergrößern (und zu standardisieren), d.h. die Eisensulfid-Teilchen so klein wie möglich zu machen. In der zu diesem Problem von E. Kaps angefertigten Diplomarbeit wird eine Methode beschrieben, mit der es möglich ist, Eisensulfid in inversen Micellen zu fällen. Diese Methode wird schon seit einigen Jahren für die Bildung von Cadmiumsulfid angewendet [72, 73, 74].

E. Kaps [75] und M. Dörr ist es gelungen, Eisensulfid-Mikro- und -Nanopartikel herzustellen. Um nachweisen zu können, ob die Vergrößerung der Oberfläche auch zu der

erwarteten Erhöhung der Aktivität führt, wurde das in inversen Micellen gefällte Eisensulfid zur reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat verwendet.

Bei Einsatz von 0,1 mmol Eisensulfid-Suspension erhält man beim Einsatz von 0,36 mmol Phenylpyruvat eine Ausbeute von 0,5 mmol Phenylalanin (39,3 %) nach 20 Stunden Reaktionszeit und längerem Stehen.

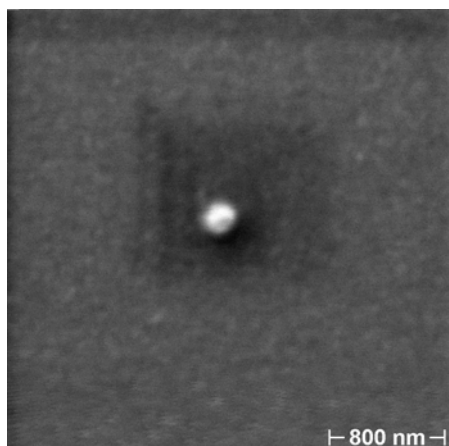


Abb. 37: Eisensulfid-Nanopartikel

Im Vergleich zu dem bisher bei dieser Reaktion verwendeten 4 mmol amorph-gefälltem Eisen-sulfid erhalten wir hier eine deutlich höhere Ausbeute. Die Analytik Untersuchung dieser Experimente erfolgte mit derselben HPLC- Methode, war aber durchaus komplizierter. Die ersten Messungen (unmittelbar nach Reaktions- ende) zeigten keinen auswertbaren Produktpeak

(keine Trennung zwischen Edukt- und Produktpeak bzw. sehr breite Peaks). Erst nachdem die Probe einige Wochen inert stehen gelassen wurde, konnte bei erneuten Probenahmen Phenylalanin in guten Ausbeuten nachgewiesen werden. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch die langen zusätzlichen Standzeiten der Versuche bei Raumtemperatur, kann ausgeschlossen werden, da Standardversuche mit Probenahme und -messung unmittelbar nach Reaktionsende und Messungen nach längeren Standzeiten zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Da sich die Eisensulfidpartikel des Reaktionsgemisches bei erstmaliger Probenahme noch nicht völlig abgesetzt hatten, wurden die Proben vor der Messung zentrifugiert. Dennoch könnten die Messungen von solchen Eisensulfidpartikeln beeinträchtigt worden sein, sodass keine saubere Peaktrennung und somit Auswertung erfolgen konnte. Die Eisensulfid-Micellen wurden bei der Herstellung durch Zugabe des Detergenz Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat-Natriumsalz (AOT) in Heptan stabilisiert. Nach Reaktionsende destabilisieren sich die Micellen und die mit AOT-behafteten Eisensulfid-Reste ordnen sich in dem Mehrphasensystem mit dem lipophilen Rest zum

Heptan (nach oben) und mit dem hydrophilen Rest zur wässrigen Lösung (nach unten) an, sodass sich das Eisensulfid in der Phasengrenze befindet.

7. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit einem Teilaspekt der Entstehung des Lebens auf der Erde; einer möglichen präbiotischen NH_3 -Synthese.

Neben Wasser ist Ammoniak einer der bedeutendsten Bausteine für die Biogenese. Über die Herkunft des für alle Aminoverbindungen essentiellen Ammoniaks gibt es zahlreiche Theorien. Die wichtigsten werden einleitend in diese Arbeit vorgestellt.

Hauptziel dieses Projektes¹, liegt in der Aktivierung kleiner Moleküle, im Einzelnen des chemisch inerten Distickstoffs. Außerdem sollte eine denkbare Strategie der präbiotischen NH_3 -Bildung durch direkte Reduktion molekularen Stickstoffs an einfachen Eisen-Schwefel-Verbindungen unter Laborbedingungen in wässrigem Milieu unter Normaldruck und Temperaturen, die 80°C nicht wesentlich überschreiten, entwickelt werden.

Es wurde im Verlauf des Projektzeitraumes eine Anlage im Pilot-Plant-Maßstab konzipiert und aufgebaut, in der mit Ansatzgrößen von 3 Mol Eisensulfid gearbeitet werden kann. Gegenstand dieser Arbeit war es, die Anlage auf- und auszubauen, zu optimieren bzw. zu automatisieren. Diese Aufgabe wurde durch eine computergestützte fünfteilige Prozesssteuerung realisiert.

Wie schon bei M. Dörr [70] beschrieben, wurde konnte der Nachweis erbracht werden, dass molekularer Stickstoff unter Ausnutzung des Reduktionspotenzials der Pyritbildung, welche von zahlreichen Röntgenpulverdiffraktogrammen nachgewiesen wurde, unter milden Bedingungen an der Eisensulfid-Oberfläche in wässriger Lösung zu Ammoniak reduziert werden kann.

¹ im Rahmen des Sonderforschungsbereichen 436 an der Friedrich-Schiller-Universität von der DFG gefördert

Da diese Untersuchungen sehr zeitintensiv waren, wurden dazu parallel in einem range-finder-Prozess Einflüsse verschiedener Parameter, wie UV-Licht oder Kombinationen von Eisen- mit weiteren Übergangsmetallsulfiden durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von molekularem Stickstoff unter UV- Licht-Bestrahlung zu höheren Ausbeuten bei gleichzeitig verringerter Eisensulfid- Menge führt. Die Aktivität der Mischsulfid von Fe(II)- mit Mn(II)-, Co(II)-, Cu(II)- und Ni(II)-Salzen wurde hauptsächlich an der Modellreaktion der reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat zur entsprechenden Aminosäure Phenylalanin experimentell untersucht. Aus den Ergebnissen abgeleitet wurden einige Mischsulfide für die UV- Versuche zur Distickstoffaktivierung verwendet, wobei sich die Kombination von Ni(II) mit Fe(II) als günstig für die Erhöhung der Ammoniak-Ausbeute herauskristallisierte.

Zusätzlich wurden die von E. Kaps und M. Dörr synthetisierten inversen Eisensulfid-Micellen auf ihre Aktivität überprüft und auch hier konnten letztendlich gute Ausbeuten an NH_3 erreicht werden.

Zusammenfassend kann man formulieren, dass mit den vorgelegten Untersuchungen die Theorie der präbiotischen Ammoniak-Bildung durch direkte Reduktion molekularen Stickstoffs gestützt wurde, aber auch durch zahlreiche Variationen des Eisensulfids oder den Reaktionsbedingungen neue Wege zur Optimierung des Experimentes aufgezeigt werden konnten.

8. Ausblick

Durch die erhaltenen Ergebnisse gibt es jetzt einige neue Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. So könnte unter anderem überprüft werden, ob auch längerwelliges Licht (Sonnenlicht?) zu höheren Ammoniakausbeuten führt.

Um Eisensulfid für andere Reduktionsreaktionen attraktiv in Bezug auf Handhabbarkeit zu machen, sollte nach Möglichkeiten zur dauerhaften, stabilen Fixierung von Eisensulfid auf Trägermaterialien, wie Molsieb, Zeolithe oder möglicherweise TiO_2 gesucht werden. Auf diese Weise würde das Eisensulfid als heterogener Katalysator in Wirbelschichtverfahren Anwendung finden.

Die Analytik des Versuches bedarf weiterer Untersuchungen. So ist es noch nicht gelungen, Ammoniak direkt aus der Reaktionsmischung zu bestimmen.

In Hinblick auf Nachhaltigkeit soll das bisherige Reaktionsspektrum des Redoxsystems FeS/FeS_2 ausgeweitet werden. Es bietet sich aufgrund der Umweltverträglichkeit von Eisensulfiden an, diese für Reduktionen in der anorganischen und organischen Chemie einzusetzen.

9. Experimenteller Teil

9.1. Darstellung von Phenylalanin

Präparation der Stammlösungen:

1M Na ₂ S-Lösung:	48,036 g Na ₂ S * 9 H ₂ O (240,18 g/mol) gelöst in 200 ml mit Schutzgas gesättigtem Millipor-Wasser
4n NaOH-Lösung:	8,00 g NaOH (40 g/mol) inert gelöst in 50 ml Wasser
0,1M Phenylpyruvat-Lösung:	651,49 mg Natriumsalz der Brenztraubensäure (186,14 g/mol) inert gelöst in 35 ml Wasser (Phenylpyruvatlösung wird jeden Tag frisch hergestellt)

Ansatz:

1,112 g (4 mmol) FeSO₄ * 7 H₂O wurden mit 1,605 g (30 mmol) NH₄Cl unter inerten Bedingungen in 10 ml Wasser gelöst. Durch die Zugabe von 4 ml 1M Na₂S-Lösung fällt amorphes schwarzes FeS aus. Zur Einstellung eines pH-Wertes von 9 (pKs-Wert von Phenylalanin 9,24) wurden 2 ml einer 4n NaOH-Lösung zugegeben. Anschließend wurden 4 ml der 0,1M Phenylpyruvat-Lösung (0,4 mmol) zugegeben. Daraus ergibt sich für den Ansatz ein Gesamtvolumen von 20 ml. Das Reaktionsgemisch wurde für 17 h bei 75 – 80°C in einem Ölbad gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur und ohne Rühren abkühlen und das FeS absetzen gelassen.

Die Analytik erfolgte mittels HPLC aus der obenstehenden klaren wässrigen Lösung, die sich beim Kontakt mit Luftsauerstoff sofort braun verfärbt. Zur Analytik des FeS-Niederschlages wurde die Suspension zentrifugiert, der klare Überstand abdekantiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Das getrocknete schwarze FeS ist weniger luftempfindlich.

9.2. Standards für die Kalibration der Gynkotheke-HPLC

Stammlösung: 4,00g Phenylalanin (165,19 g/mol) gelöst in 200 ml Wasser

Standard 1: 400,70 mg (2,43 mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 2,43 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 2: 300,53 mg (1,82 mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 1,82 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 3: 200,35 mg (1,21 mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 1,21 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 4: 160,28 mg (0,97mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 0,97 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 5: 120,21mg (0,73mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 0,73 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 6: 100,18 mg (0,61mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 0,61 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 7: 80,14 mg (0,49 mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 0,49 μ mol / 100 ml vermessene Probe

Standard 8: 60,11 mg (0,36mmol) Phenylalanin in 100 ml Wasser
= 0,36 μ mol / 100 ml vermessene Probe

9.3. Reduktion von Phenylpyruvat ohne NH_4Cl

Ansatz:

Zu 1,12 g (4 mmol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wurde inert gelöst in 10 ml Wasser wurden 4 ml der 1M Na_2S -Lösung gegeben und somit amorphes schwarzes FeS ausgefällt. Durch Zugabe von 2 ml 4n NaOH-Lösung wurde der pH-Wert der Reaktionsmischung auf pH = 9

eingestellt. Anschließend folgte die Zugabe von 4 ml (0,4 mmol) 0,1M Phenylpyruvat-Lösung. Nach 17 h Reaktionszeit bei 75 – 80°C wurde bei Raumtemperatur abkühlen und absetzen gelassen.

9.4. Reduktion von Phenylpyruvat mittels Mischsulfiden

Ansatz:

4, 2, 3,75 und 3,875 mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wurden entsprechend mit 0, 2, 0,25 und 0,125 mmol Übergangsmetallsalze (Mn(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Mo(..) und V(..)) und 1,605 g (30 mmol) NH_4Cl unter inerten Bedingungen in 10 ml Wasser gelöst. Durch die Zugabe von 4 ml 1M Na_2S -Lösung fällt amorphes schwarzes FeS aus. Zur Einstellung eines pH- Wertes von pH = 9 wurden 2 ml einer 4n NaOH-Lösung zugegeben. Anschließend wurden 4 ml der 0,1M Phenylpyruvat-Lösung (0,4 mmol) zugegeben. Daraus ergibt sich für den Ansatz ein Gesamtvolumen von 20 ml. Das Reaktionsgemisch wurde für 17 h bei 75 – 80°C in einem Ölbad gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur und ohne Rühren abkühlen und das FeS absetzen gelassen.

9.5. Reduktion von Phenylpyruvat unter UV-Licht-Bestrahlung

Ansatz:

3,90 g (14 mmol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wurden mit 5,62 g (105 mmol) NH_4Cl unter Argonstrom im Reaktor in 35 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 14 ml einer 1M Na_2S -Lösung wurde amorphes schwarzes FeS ausgefällt. Mit 7 ml 4n NaOH-Lösung wurde der pH- Wert des Reaktionsgemisches auf pH = 9 eingestellt. Anschließend wurden 14 ml einer 0,1M Phenylpyruvat-Lösung zugegeben und bei 75°C für 5 h (24 h) mit UV-Licht bestrahlt. Die Reaktionstemperatur wurde mittels Thermostat überprüft. Durch einen

leichten Argonstrom und Rühren wurde das FeS homogen in der Reaktionslösung verteilt.

9.6. Reduktion von Stickstoff zu Ammoniak

Ansatz:

824 g (3 mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ werden in 3 l und 720 g (3 mol) Na_2S * in 4 l mit Argon gesättigtem dest. Wasser gelöst und FeS kalt gefällt. Die FeS/FeS₂/Wasser-Suspension wird dann auf 80°C erwärmt. Im Anschluss wird der pH-Wert durch Zugabe von 40 ml 10M NaOH-Lsg. von pH=6 auf pH>11 eingestellt und ein Argonstrom von ca. 14 l/h angelegt.

Argon wie auch Stickstoff werden, bevor sie in das Reaktionssystem eingeleitet werden, durch eine 4-stufige Prozedur gereinigt. Danach leitet man Argon mit dem oben eingestellten Strom durch die Suspension um die eventuell vorhandenen Ammonium-Verunreinigungen der eingesetzten Ausgangsstoffe auszutreiben. Die Analytik dazu erfolgt täglich mittels optischen Merck-Test (nach Berthelot-Reaktion) aus der Vorlage (n/1000 H_2SO_4).

Nachdem der Merck-Test Aquaquant® negativ ausfällt, wird durch tropfenweise Zugabe von 80 ml 2:1 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ein pH-Wert von 4 eingestellt und auf einen Stickstoffstrom von 5 l/h umgestellt. Man kann jetzt deutlich H_2S -Geruch wahrnehmen. Für 14 Tage wird keine weitere Veränderung vorgenommen.

Anschließend stellt man den pH-Wert durch Zugabe von 150 ml 10M NaOH-Lsg. auf ca. pH=14 und den Argonstrom auf 14 l/h ein. Man nimmt wiederum 14 Tage keine weiteren Änderungen vor. Durch diese Maßnahmen wird das gebildete Ammoniak aus dem System ausgetrieben und in einer Vorlage, gefüllt mit n/1000 H_2SO_4 , aufgefangen. Nach Beendigung des Versuches schließen sich analytische Untersuchungen an, die Aussagen über den Gehalt an Ammoniak treffen.

9.7. Reduktion von Stickstoff unter UV-Licht-Bestrahlung

Ansatz:

0,29 mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,01 mol $\text{MSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($\text{M} = \text{Mn(II)}, \text{Co(II)}, \text{Cu(II)}, \text{Ni(II)}$) wurden in 250 ml Wasser gelöst. Mit einer Schlauchpumpe (20 U/min) wurde über eine Kanüle 0,3 mol Na_2S gelöst in 250 ml Wasser langsam zugegeben und so das M/FeS fein ausgefällt. Anschließend wurde der Dünnschichtreaktor mittels Kryostat auf 60°C erhitzt und die FeS -Suspension hindurch gepumpt. Der pH-Wert wurde mit etwa 6 ml H_2SO_4 (2:1) auf 3 – 4 eingestellt und ständig ein Stickstoffstrom durch die Apparatur geleitet. Nach etwa 2 Wochen Reaktionszeit (Umlaufapparatur und UV-Lampe wurde abgestellt) wurde die schwarze Suspension mit 10M NaOH -Lösung auf $\text{pH} = 10 - 11$ eingestellt und im Argonstrom das in der Reaktionsmischung entstandene und gespeicherte Ammoniak ausgetrieben. Dieses wurde dann als Ammonium in einer $n/1000 \text{H}_2\text{SO}_4$ aufgefangen. Zur Bestimmung des Ammonium wurde der optische Test Merck Aquaquant und der Enzym-UV-Test verwendet.

Zur Analytik der Zusammensetzung der Suspension wurde eine Probe des Mischsulfides entnommen, im Vakuum getrocknet und mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersucht.

9.8. Reduktion von Stickstoffmonoxid

28,048 g (0,1 mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wurde in 200 ml Wasser inert gelöst und in einem Kolben vorgelegt. Dazu wurden 100 ml 1M Na_2S -Lösung zugegeben und damit FeS ausgefällt. Der pH-Wert wurde mit 5 ml 10M NaOH -Lösung auf $\text{pH} = 11$ eingestellt. Anschließend wurde die FeS -Suspension über Nacht mit Argon durchströmt, um eventuelle Ammoniakverunreinigungen der Ausgangsstoffe auszutreiben. In der

n/1000 H_2SO_4 aus dem nachgeschalteten Auffanggefäß (gefüllt mit 100 ml) fiel der optische Merck-Test negativ aus.

Für die Darstellung von Stickstoffmonoxid wurden 5 g Kupfer-Späne unter ständigem Rühren tropfenweise innerhalb 1 h mit 50 ml 30%iger HNO_3 versetzt. Das dabei freiwerdende Gas wurde durch ein Gefäß mit H_2O geleitet, um sicher zu gehen, dass nur Stickstoffmonoxid für die Reaktion zur Verfügung steht.

Der pH-Wert der FeS-Suspension wurde nun durch Zugabe von 6 ml H_2SO_4 (2:1) auf $\text{pH} = 3$ eingestellt und das frisch hergestellte Stickstoffmonoxid im leichten Argonstrom durch die Suspension geleitet. Nach etwa 1 h Reaktionszeit, waren die Kupfer-Späne komplett gelöst und somit war die Stickstoffmonoxid-Entwicklung abgeschlossen. Der pH-Wert der FeS-Suspension wurde wieder auf $\text{pH} = 10 - 11$ eingestellt, um das entstandene Ammoniak aus der Suspension auszutreiben.

Zur qualitativen Bestimmung des Ammoniakgehaltes wurde der Merck-Test Aquaquant® und zur quantitativen Bestimmung der UV-Enzym-Test durchgeführt.

9.9. Reduktive Aminierung von Phenylpyruvat mittels FeS-Micellen

Darstellung der FeS-Micellen:

Alle Arbeiten werden möglichst unter Argon durchgeführt. Es werden 50 ml Heptan und 3,5 g AOT (Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat-Natriumsalz = Dihexylnatriumsuccinat) in einen 100 ml Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr, Stopfen, schnelllaufenden Magnetprüher und Septum gegeben. Jetzt wird cirka 15 min über das Gaseinleitungsrohr Argon durch die gerührte Heptanlösung geleitet - zum Druckausgleich wird eine Kanüle in das Septum gesteckt. Anschließend wird 1 ml sauerstofffreies Wasser zugegeben und eine Stunde möglichst schnell gerührt. Im Folgenden werden etwa 20 ml des Heptans abgetrennt und unter kräftigem Rühren 0,16

– 1,0 ml einer 1M sauerstofffreien wässrigen Na_2S -Lösung zugegeben. In die restlichen 30 ml Heptanlösung wird das 1,1-1,5 fache Volumen einer 1M sauerstofffreien wässrigen $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ -Lösung zugegeben. Beide Lösungen werden 1 Std. kräftig gerührt. Zur Fällung des FeS wird anschließend die Na_2S -Lösung langsam mit einer Spritze zu der $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ Lösung gegeben, wobei sich eine tiefschwarze, aber klare Lösung bilden sollte, welche weiter kräftig gerührt wird.

Zum Nachweis der Nanopartikel wird etwas von der Reaktionslösung auf ein Objektträgerglaschen gebracht, im Vakuum getrocknet und 2-3mal mit Heptan gewaschen. Dabei bilden sich meist Klumpen und der größte Teil der Partikel wird weggespült.

Ansatz:

30 mmol NH_4Cl wurden in 5 ml mit Argon gesättigtem Wasser gelöst und 5 ml 0,1M Phenylpyruvat-Lösung zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 200 μl 4n NaOH-Lösung auf pH = 9 eingestellt. Anschließend wurden zu der wässrigen Reaktionsmischung 20 ml FeS-Micellen zugegeben und 20 h bei 80°C gelassen. Um eine ausreichende Durchmischung des Mehrphasensystems zu gewährleisten, wurde auf höchster Stufe gerührt. Zur Analyse wurde aus der wässrigen Phase eine Probe für die HPLC entnommen.

10. Literaturverzeichnis

- 1 M. Neukamm, *Dispute und Essays zu Evolution und Kosmologie*, 2000,
<http://www.martin-neukamm.de>
- 2 <http://www.meteor.tu-darmstadt.de/umet/script/Kapitel1/kap01.html>,
„Grundlagen der Umweltmeteorologie“, 10.10.2003.
- 3 <http://science.orf.at/science/news/63165>, 12.2002.
- 4 K. Rupp, „Ältestes Fossil der Erde?“, 07.03.2002.
- 5 A.I. Oparin, *Proiskhozhdenie Zhizny* [The Origin of Life]. Izd. Moskovskiy Rabochiy, Moscow. 1924.
- 6 Oparin, *The Origin of Life*; Macmillan: New York, 1938;
- 7 J.B.S. Haldane, The origin of life. *Rationalist Annual* 1929,
148-169.
<http://www.bernd-leitenberger.de/leben.html>, „Die Entstehung des Lebens auf der Erde Teil 1“, 09.2003.
- 9 S.L. Miller, *Science* 1953, 117, 528-529.
- 10 K. Strobach, Stuttgart, Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, 2001.
www.geist-oder-materie.de/Evolution/Biol_Evolution/Ursuppe/ursuppe.html
- 11 Facharbeit, <http://members.taunusstein.net/~gravitation/miller2.html#20>
- 12 E.G. Beck, <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-50.htm>
- 13 S. Arrhenius, „Lehrbuch der kosmischen Physik“, 1903.
- 14 D. Hoß, „Forscher belegen: Lebensspuren können auf Meteoriten durchs All
resen“, <http://www.faz.net/s/Rub02DBAA63F9EB43CEB421272A670A685C/Doc~E44AE1EEE86DE4D238930B3F1C41CBCDB~ATpl~Ecommon~Scontent.html>,
2002.
- 15 J. Kissel, F.R. Krueger, *Spektrum der Wissenschaft*, Mai 2000.
- 16 K. Sparwasser, „Entstehung des Lebens auf der Erde“, *Illustriert Videnskab*,
Nr. 6, 2002.
- 17 M. P. Bernstein, J.P. Dworkin, S.A. Sandford, G.W. Cooper, L.J. Allamandola,

- Nature*, **2002**, 416, 401-403.
- 18 G.M. Munoz Caro, U.J. Meierhenrich, W.A. Schutte, B. Barbier, A. Arcones Segovia, H. Rosenbauer, W.H.-P. Thiemann, A. Brack, J.M. Greenberg, *Nature*, **2002**, 416, 403-406.
- 19 http://www.ulimicksch.de/YEL/3_2.html
- 20 S. Butt, T. Fischer, C. Goldbeck, W. Meschede, F. Poppe, I. Walter, "Entdeckungen in der Tiefsee" **2002**, <http://www.quarks.de/dyn/5569.phtml>
- 21 G. Wächtershäuser, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, **1990**, 20, 173-176.
- 22 G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, 52, 452-484.
- 23 G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 200-204.
- 24 C.-I. Brändén, G. Schneider: Carbon Dioxide Fixation and Reduction in Biological and Model Systems, *Oxford University Press, Oxford, U K*, **1994**, 239-248.
- 25 P. v. Sengbusch, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d41/41a.htm>
- 26 S. Krall, [home.nexgo.de/volker.knapp-diederichs/ Krall_Biogenese.pdf](http://home.nexgo.de/volker.knapp-diederichs/Krall_Biogenese.pdf)
- 27 J. Rabl, <http://www.julius-rabl.de/leben/wachter.html>
- 28 K. Küsel, A. Schramm, *Mikrobiologisches Praktikum für Geoökologen/innen*, Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, BITÖK, Universität Bayreuth
- 29 T. M. Bricker, *Photosynth. Res.* 24, 1-13, **1990**.
- 30 H. V. Scheller, H. Naver, B. L. Moller () Molecular aspects of photosystem I. *Physiol Plant*, **1997**, 100, 842-851.
- 31 J. W. Lee, C. V. Tevault, T. G. Owens, E. Greenbaum, *Science* **1996**, 273, 364.
- 32 M. Arnold, *Dissertation*, **2001**
- 33 D. Schneider, *Dissertation*, **2000**
- 34 FSU, Sonderforschungsbereich 436, *Arbeits- und Ergebnisbericht* **2000-2002**
- 35 O. Hampel, C. Rode, D. Walther, R. Beckert, H. Görls, *Z. Naturforschg* 22, 57b, 946
- 36 D. Hafenbradl, M. Keller, G. Wächtershäuser, K.O. Stetter, *Tetrahedron Letters* **1995**, 29, 5179-5182.

- 37 A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg-Berlin-Oxford, **1994**, 788-798.
- 38 G. Czihak, H. Langer, H. Ziegler, *Biologie*, 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork, **1992**, 97-98.
- 39 N.A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg-Berlin-Oxford, **1997**, 562.
- 40 Schindelin et al, *Nature* **1997**.
- 41 Chiu et al, *Biochemistry* **2001**
- 42 D.C. Rees, M.K. Chan und J. Kim, *Adv. Inorg. Chem.* **1993**, 40, 89-119; J. Kim und D.C. Rees, *Biochemistry* **1994**, 33, 389-397; M.M. Georgiadis, H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J.J. Kornuc, D.C. Rees, *Science* **1992**, 257, 1653-1659.
- 43 J. Kim, D.C. Rees, *Science* **1992**, 257, 1677.
- 44 B. K. Burgess, D. J. Lowe, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2983-3011.
- 45 S. Siemann, K. Schneider, M. Dröttboom, A. Müller, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1650-1661; E. Krah, B.J.R. Weiss, M. Kröckel, J. Groppe, G. Henkel, S.P. Cramer, A.X. Trautwein, K. Schneider, A. Müller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 7, 37-45.
- 46 M. Appl, *Ammonia: Principles and Industrial Practice*, VCH-Verlag, Weinheim, **1999**, 236.
- 47 F. Haber, *DRP 229126 (1909)*, *DRP 238450 (1909)*.
- 48 N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie der Elemente*, VCH-Verlag, Weinheim, **1990**, 536-539.
- 49 H. Bielawa, O. Hinrichsen, A. Birkner, M. Muhler, *Angew. Chem.* **2003**, 15, 1579-1581.
- 50 A.D. Allen, C.V. Senoff, *Chem. Commun.* **1965**, 621.
- 51 M.D. Fryzuk, S.A. Johnson, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200-202, 379-409.
- 52 T.A. Bazhenova, A.E. Shilov, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, 144, 69.
- 53 G. Marnellos und M. Stoukides, *Science* **1998**, 282, 98-100.
- 54 D. Sellmann, D. Häußinger, F. Heinemann, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1715.

- 55 N.N. Rao, S. Dube und N.P. Manjubala, *Applied Catalysis B – Environmental* 5 **1994**, 33-42.
- 56 R. M. Hazen, *Spektrum der Wissenschaft* **2001**, 34-41.
- 57 Y. Nishibayashi, S. Iwai, M. Hidai, *Science* **1998**, 279, 540-542.
- 58 C. E. Laplaza, M. J. A. Johnson, J. C. Peters, A. L. Odom, E. Kim, C. C. Cummins, G. N. George, I. J. Pickering, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8623-8638.
- 59 C. E. Laplaza, A. R. Johnson, C. C. Cummins, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 709-710.
- 60 M. A. A. Schoonen, Y. Xu, *Astrobiology* **2001**, 1, 133-140.
- 61 D. V. Yandulov, R.R. Schrock, *Science* **2003**, 301, 76-78.
- 62 W. Martin, M. J. Russell, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **2003**, 358, 59-85.
- 63 K. Fajans, F. Richter, Das Verhalten der Radioelemente bei Fällungsreaktionen, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **1915**, 48, 700-716.
- 64 D. Hafenbradl, M. Keller, G. Wächtershäuser, K.O. Stetter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 5179.
- 65 H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart **1991**, 826.
- 66 J. Schapp, *Diplomarbeit*, München, **1997**.
- 67 P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987
- 68 J. Schapp, *Diplomarbeit*, München **1997**, 20.
- 69 O. Rusina, O. Linnik, A. Eremenko, H. Kisch, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, No. 2, 561-565.
- 70 M. Dörr, *Dissertation*, Jena, **2004**.
- 71 A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg: "*Lehrbuch der Anorganischen Chemie*"; Berlin: W. deGruyter, **1995** (101. Aufl.), S. 691-692.
- 72 P. Lianos, J. K. Thomas, *Chemical Physics Letters*, **1986**, 125, 299-302.
- 73 P. Lianos, J. K. Thomas, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1987** 117, 505-512.
- 74 M. Dörr, G. Kreisel, G. Völksch, W. Weigand (), *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2003**, 629, 1113-1115.
- 75 E. Kaps, *Diplomarbeit*, Jena, **2003**.